

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

Isolierung und Wirkungsweise
eines Wachstumsfaktors
(Biotin)
aus Extrakten von Bäckerhefe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg a. d. Lahn

vorgelegt von

Klaus Pankotsch
aus München

Marburg 1969

Klaus Pankotsch

Isolierung und Wirkungsweise eines Wachstumsfaktors (Biotin)
aus Extrakten von Bäckerhefe

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Marburg/Lahn

Direktor: Prof. Dr. med. W. Schmid

ISOLIERUNG UND WIRKUNGSWEISE
EINES WACHSTUMSFAKTORS (BIOTIN)
AUS EXTRAKTEN VON BÄCKERHEFE

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Zahnheilkunde der Hohen Medizinischen Fakultät

der Philipps - Universität zu Marburg a.d. Lahn

vorgelegt von

Klaus PANKOTSCH

aus München

Marburg 1969

Angenommen von der Medizinischen
Fakultät der Philipps - Universität
Marburg a.d. Lahn am: 10.02.1969

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. W. Straub

Referent: Prof. Dr. med. W. Schmid

Correferent: Prof. Dr. med. Dr.med.dent.habil. H.Heuser

MEINEN ELTERN

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	<u>Seite</u>
1. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2. ALLGEMEINER TEIL	3
2.1. Fraktionierung eines Perchlorsäureextraktes aus Hefezellen	4
2.1.1. Herstellung einer einheitlichen Zellpopulation	4
2.1.2. Wachstumsversuche mit Hefezellen	6
2.1.3. Herstellung des 1,9%igen Perchlorsäureextraktes	7
2.1.4. Trennungsversuche am PCE ohne Säule	12
2.1.4.1. Vorfraktionierung des PCE Extraktes	12
2.1.4.2. Fraktionierung des PCE nach STAS-OTTO	13
2.1.4.3. Ergebnis des Untersuchungsganges nach STAS-OTTO	16
2.2. Säulenchromatographische Trennung des PCE	16
2.2.1. Apparatur zur Säulenchromatographie	17
2.2.2. Vorbereitung der Säulen	17
2.2.3. Auftragen des Extraktes	18
2.2.4. Apparative Anordnung zur Elution	18
2.2.5. Registrierung der Elutionskurve	18
2.2.6. Elution	19
2.2.7. Ergebnisse der Säulenchromatographie	21
2.3. Verarbeitung der Eluate nach Säulenchromatographie	22
2.3.1. Wässrige Vorfraktion	22
2.3.2. Säurelösliche Fraktionen	22
2.3.3. Beobachtungen während der Eluatverarbeitung	23
2.4. Schichtchromatographie der Fraktion N IX	24
2.4.1. Adsorptionsmittel	24
2.4.2. Fließmittel	24
2.4.3. Aufarbeiten der Substanz nach Schichtchromatographie	25
2.4.4. Ergebnisse der Schichtchromatographie	25

	<u>Seite</u>
2.5. Rechromatographie der Fraktion N IX	30
2.5.1. Gelfiltration an Sephadex G-10	30
2.5.1.1. Vorbereitung des Gels	31
2.5.1.2. Trennsäule	31
2.5.1.3. Auftragen der Probe	31
2.5.1.4. Elutionsmittel	32
2.5.1.5. Registrierung und Einteilung des Elutionsdiagrammes	32
2.5.1.6. Wachstumsversuche	32
2.5.1.7. Ergebnisse der Gelfiltration	33
2.6. Darstellung des sprossungsaktiven Wirkstoffes	35
2.6.1. Hinweise zur Identifizierung der Fraktion N IX	35
2.6.2. Biologische Beweisführung	36
2.6.2.1. Vergleich der Wirkung von Fraktion N IX und D(+) Biotin	36
2.6.2.2. Ergebnisse des biologischen Vergleichs	39
2.6.3. Biologischer Nachweis der Identität des Biotin mit Fraktion N IX (Hemmversuche mit Avidin)	43
2.6.3.1. Ergebnisse	46
3. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	47
4. ZUSAMMENFASSUNG	51
5. EXPERIMENTELLER TEIL	53
5.1. Nährmedium zur Herstellung des Perchlorsäure- extraktes	54
5.1.1. Herstellung des Hefekochsaftes	54
5.1.2. Zusammensetzung der Nährlösung nach WILLIAMSON	54
5.2.1. Darstellung des Analysenganges nach STAS-OTTO	54
5.2.2. Schema des STAS-OTTO-GANGES	55
5.3. Ammoniumformiatpuffer zur Elution der säurelöslichen Fraktionen	55
5.4. Gesamtansatz eines jeden Sprossungs- versuchs	55
5.5. Sprossungswirkung der Kontrollösung (Tab. 12)	57
6. LITERATURVERZEICHNIS	58

1. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Im Rahmen einer Untersuchung über Faktoren, welche nach abgeschlossenem Wachstum die Vermehrung von Einzelzellen in Gang bringen, war an Hefezellen bei der Trennung von Nucleotiden aus Hefeextrakten eine Fraktion angefallen, welche für sich allein Sprossung auslöste (WORTBERG⁽²¹⁾). Dies war bei Zellen der Fall, die nach einer fraktionierten Zentrifugation als "ausgewachsen" angesehen werden konnten.

In der vorgelegten Arbeit werden die Versuche fortgeführt und versucht, aus der Rohfraktion, die nach dünnenschichtchromatographischer Auftrennung mindestens sechs bis acht Einzelsubstanzen enthält, den wirksamen Sprossungsfaktor zu isolieren.

Als wichtige Voraussetzung für die Beurteilung der Wirksamkeit isolierter Testsubstanzen hat es sich bewährt, Hefezellen zu verwenden, die, was Größe und Stoffwechsellage betrifft, möglichst einheitlich waren. Hier war von STOSSEK⁽¹⁹⁾ und JACOBI⁽⁹⁾ ein Verfahren ausgearbeitet worden, bei dem mit Hilfe der fraktionierten Zentrifugation sog. k l e i n e und g r o ß e Zellen zu gewinnen sind. Die großen Zellen sind dadurch charakterisiert, daß sie eine durchschnittliche Größe von 5,5 μ besitzen und nach Zusatz der zu untersuchenden Fraktion N IX (WORTBERG⁽²¹⁾) innerhalb kurzer Zeit ($1 \frac{1}{2}$ bis $2 \frac{1}{2}$ Stunden) eine Sprossung bis zu 100% aufwiesen. Die kleinen Zellen besitzen einen Durchmesser von etwa 3 μ und benötigen bis zum Beginn der Sprossung eine Zeit von etwa 3 - 4 Stunden. Als Voraussetzung zur Sprossung wurde von STOSSEK⁽¹⁹⁾ gefunden, daß die Hefezellen erst zu einer bestimmten Größe heranwachsen müssen, um zur Sprossenbildung fähig zu sein. Die sog. großen Zellen weisen bezüglich der Synthese von DNS die Merkmale einer Synchronisation auf (STOSSEK⁽¹⁹⁾). Die Herstellung solcher Zellen war die Voraussetzung für die Gewinnung der bereits gefundenen sprossungsanregenden Fraktion, die durch säulenchromatographische Trennung eines bekannten Perchlorsäureextraktes zu isolieren war.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Fraktionierung eines Perchlorsäureextraktes aus Hefezellen

2.1.1. Herstellung einer einheitlichen Zellpopulation

Ausgangsmaterial aller Versuche war käufliche Bäckerhefe der Firma Moormann/Lippe. Laut Angabe des Herstellers handelte es sich dabei um eine Mischung zweier Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*. Um möglichst frische und damit wachstums- und sprossungsfähige Zellen zu erhalten, wurde die Hefe erst am Tage des Transports beim Hersteller geschöpft und am selben Tage nach Ankunft im Marburg (4 Std. Transport) im Kühlschrank bei 4 C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Längere Lagerzeiten bei der Herstellerfirma wurden somit umgangen.

Wesentlich für die Herstellung eines standardisierten Hefeextraktes war eine weitgehend einheitliche Zellpopulation. Hierzu sollten Zellen gewonnen werden, die sich in einer definierten Stoffwechselphase befanden. Wir wählten das Stadium der Zellvermehrung, das der Abstoßung gebildeter Zellsporen vorausging.

Nach STOSSEK⁽¹⁹⁾ wachsen Hefezellen zunächst bis zu einer durchschnittlichen Zellgröße von 5,5 bis 6,0 μ (Micron) Durchmesser heran und beginnen dann zu sprossen. Solche sprossbereiten Zellen ließen sich durch fraktioniertes Zentrifugieren nach JACOBI⁽⁹⁾ gewinnen. Dazu werden verschiedene Sedimentationsgeschwindigkeiten kleiner und größer Zellen benutzt. Während WORTBERG⁽²¹⁾ das angelieferte Material sofort verwendete, fanden wir eine bessere Ausbeute großer Zellen sowie eine wesentliche Verkürzung dieses Arbeitsganges durch Belüftung nach vorausgegangenem dreimaligem Zentrifugieren bei 1200 U/min.

Hierzu wurde eine mit Nährlösung nach WILLIAMSON⁽²⁰⁾ (s. exp. Teil 5.1.2.) und Hefekochsaft (s. STOSSEK⁽¹⁹⁾) versetzte Hefesuspension benutzt, die nach dreimaligem Waschen, durch Zentrifugieren in einem thermostatierten Wasserbad von konstant 30 C inkubiert wurde. Das prozentuale Verhältnis des Hefekochsaftes und der Nährlösung im Nährmedium setzte sich aus 10% Hefekochsaft und 90% Salzlösung zusammen. Der Inkubationsraum war eine 250 ml Waschflasche, versehen mit einem Schliffansatz, von dem aus ein Rohr bis zum Boden des Gefäßes ausgezogen war. Mit Hilfe dieses Rohres wurde über eine Membranpumpe Luft in das Innere des Gefäßes gepumpt. Die Luft durchströmte zuvor eine mit Wasser gefüllte Waschflasche. Dadurch wurde eine Wasserdampfsättigung bei Versuchstemperatur erreicht. Gleichzeitig wurde ein aerobes Milieu und eine gleichmäßige Verteilung der im Nährmedium suspendierten Zellen erreicht (WORTBERG⁽²¹⁾).

Von besonderer Wichtigkeit war der Zusatz von Hefekochsaft, der 10% des gesamten Versuchsansatzes ausmachte. Er enthält in großen Mengen sprossungsanregende Substanzen. Ziel des Belüftungsbades zur Herstellung einheitlicher Zellen war jedoch nicht, gesproßte Zellen zu erhalten (s. Herstellung des Perchlorsäureextraktes 2.1.3.), sondern den Wachstumsprozess der Hefezellen in dem Augenblick zu unterbrechen, in dem die Zellen eine durchschnittliche Größe von etwa 5,5 μ erreicht hatten, ohne daß sie jedoch soviel sprossungsanregende Substanz in sich aufgenommen hatten, daß es zur spontanen Sprossung kommen konnte. Dieser Zeitpunkt lag etwa 35 Minuten nach Beginn des Belüftungsvorganges. Um eine Sprossenbildung von 80 - 90% zu erhalten, wäre eine Dauer des Belüftungsbades von etwa 130 - 150 Minuten erforderlich gewesen (s. Herstellung des Perchlorsäureextraktes).

Die Unterbrechung des Wachstumsvorganges erfolgte durch Abnutschen des Nährmediums mittels einer Wasserstrahlpumpe durch ein Membranfilter mittlerer Porengröße. Mit eisgekühltem Aqua bidest. wurde solange nachgespült, bis im Hefefiltrat keine Cl^- und SO_4^{--} -Ionen des Nährsalzes mehr nachweisbar waren.

Die gewonnenen Hefezellen wurden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.1.2. Wachstumsversuche mit Hefezellen

Zur Durchführung der Sprossungsversuche diente eine dem Belüftungsbad ähnliche Versuchsanordnung. Eine eingehende Beschreibung des Inkubationsraumes sowie dessen Belüftung ist bei WORTBERG⁽²¹⁾ zu finden.

Da in der weiteren Folge des Versuchsablaufes dieser Arbeit die Ermittlung einer sprossungsanregenden Substanz bei Hefezellen im Vordergrund stand, war es erforderlich, neu gewonnene Stoffe jeweils im Keimtest auf biologische Aktivität zu prüfen. Die Versuchsbedingungen waren konstant zu halten, um verschiedene Substanzen vergleichend gegenüberstellen zu können, d.h. also, die prozentualen Anteile von Nährsalz, optimalem Wirkungsquantum der Testsubstanz und suspendierter Hefemenge mußten einander entsprechen. Zu beachten waren zudem das Alter der verarbeiteten Hefe, Temperatur des Inkubationsraumes, die durch das Belüftungsbad (2.1.1.) erreichte durchschnittliche Größe der "Wachstumshefe", sowie pH-Veränderung durch Zugabe der verschiedenen Prüfstoffe.

Die zu Wachstumsversuchen benutzten Hefezellen mußten nach spätestens acht Tagen jeweils neu hergestellt werden (2.1.1.).

Bei allen Versuchen wurde ein Gesamtansatz von 1,0 ml gewählt. Hiervon waren 0,1 ml zehnfach konzentriertes Nährsalz nach WILLIAMSON⁽²⁰⁾ (5.1.2.), während sich die restlichen 0,9 ml der Probe aus gelöster Testsubstanz und suspendierter Hefe zusammensetzten. (Gesamtansatz eines jeden Sprossungsversuchs s. exp. Teil 5.4.)

Bei allen Sprossungsversuchen liefen parallele Kontrollversuche unter denselben Bedingungen mit. Bei diesen fehlte jeweils die zu testende Substanz, d.h. die Zellen waren lediglich in Glucoselösung und Nährsalzlösung nach WILLIAMSON⁽²⁰⁾ suspendiert. Die Sprossungsraten und Mittelwerte sind im exp. Teil 5.5. Tabelle 12 zu entnehmen.

2.1.3. Herstellung des 1,9%igen Perchlorsäureextraktes

Die Herstellung des Extraktes erfolgte in modifizierter Form nach SCHMITZ⁽¹⁸⁾, STOSSEK⁽¹⁹⁾ und WORTBERG⁽²¹⁾.

Dabei handelte es sich um eine 2,1%ige Hefesuspension, die in einem Wasserbad von 30 C inkubiert wurde (2.1.1.). Die Zellen sollten sich nahe dem Stadium der Zellteilung befinden, d.h. kurz vor der Bildung einer Tochterzelle. Als Maß dieses erreichten Stoffwechselstadiums diente der prozentuale Anteil von gesproßten Zellen (80%), der im Nährmedium suspendierten einheitlichen Zellpopulation.

Die Entnahme der Hefesuspension aus dem Belüftungsbad erfolgte nach 150 Minuten, da zu diesem Zeitpunkt die Sprossenbildung der Hefezellen 80 - 90% betrug und die Trennung von Sproß und Mutterzelle unmittelbar bevorstand. Um der Zelle das Nährmedium möglichst rasch zu entziehen, d.h. also, um den Schritt der Sprossenabstoßung zu vermeiden, trennte WORTBERG⁽²¹⁾ die Hefesuspension sofort nach Ablauf der angegebenen Sprossungszeit mit Hilfe einer vorgekühlten Nutsche und einer Wasserstrahlpumpe durch Membranfiltration. Der Überstand von Hefezellen wurde in flüssige Luft geworfen und somit ein augenblicklicher Stop der Stoffwechselvorgänge erreicht.

Da das Trennen des Nährmediums von den Hefezellen durch das Abnutschen wegen technischer Schwierigkeiten nicht immer in gleichen Zeitabständen durchzuführen war, erschien das Abzentrifugieren des Nährmediums in der Zentrifuge nach folgendem Modus günstiger:

- 1) Abzentrifugieren des Nährmediums 3500 x g
- 2) Waschen der Hefe mit 500 ml Aqua demin.
- 3) Abzentrifugieren der Flüssigkeit
- 4) Nachwaschen der Hefe mit 200 ml Aqua demin.
- 5) Abzentrifugieren.

Das zweimalige Waschen der Hefe nach deren Trennung vom Nährmedium war erforderlich, um mit Sicherheit die zwischen den Hefezellen verbliebenen Reste des Nährsalzes auszuwaschen, da diese Salze in ionisierter Form bei der späteren säulenchromatographischen Auftrennung des Perchlorsäureextraktes die Säule belasten würden (STOSSEK⁽¹⁹⁾). Im zweiten Waschwasser konnten mit Ag NO_3 und Ba Cl_2 keine Cl^- - und SO_4^{--} Ionen im Waschwasser nachgewiesen werden.

Die vom Nährmedium getrennten Hefezellen wurden im Kühlraum (+ 2 C) sofort mit einer 64%igen kalten Perchlorsäure (+ 2 C) versetzt und zwar wurden 10 ml pro 2,1 g Ausgangshefe zugegeben (WORTBERG⁽²¹⁾). Anschließend erfolgte die Extraktion 30 Minuten unter Rühren auf dem Magnetrührer. Die Trennung des Extraktes von den durch die HClO_4 abgetöteten Zellen erfolgte durch Zentrifugieren bei 3500 x g. Der Überstand wurde dekantiert und mit einer Elektrode und kalter 1n-KOH (2 C) auf dem Magnetrührer neutralisiert. Die von WORTBERG⁽²¹⁾ gebrauchte 3n KOH wurde nicht verwandt, um eine lokal mögliche Überalkalisierung des Extraktes zu vermeiden. Da eine vollständige Ausfällung des entstehenden KClO_4 bei Erreichung des Neutralpunktes nicht sofort zu erwarten ist, wurde der neutralisierte Extrakt noch ca. 12 Stunden im Kühlraum gelagert, um den weiteren Ausfall des in der Kälte nachfallenden KClO_4 zu begünstigen. Danach wurde der Überstand in der Zentrifuge bei + 2 C fünf Minuten bei 4200 x g abzentrifugiert.

Der hergestellte Extrakt wurde im Rotationsverdampfer bei 40 C (Badtemperatur) eingeeengt und im 100 ml Meßzylinder aufgefüllt aufbewahrt. Zur Kontrolle der konstant gehaltenen Herstellung des Perchlorsäureextraktes diente das Spektrum im UV-Bereich. Zur Registrierung des UV-Spektrums mußte der auf 100 ml aufgefüllte Extrakt 1:50 verdünnt werden (s. Abb. 1).

Die Wirkung verschiedener Konzentrationen des Perchlorsäureextraktes und des Hefekochsaftes im Sprossungsversuch mit Hefezellen sind aus Tab. 1 und Abb. 2 ersichtlich.

UV-Spektrum des Perchlorsäureextraktes

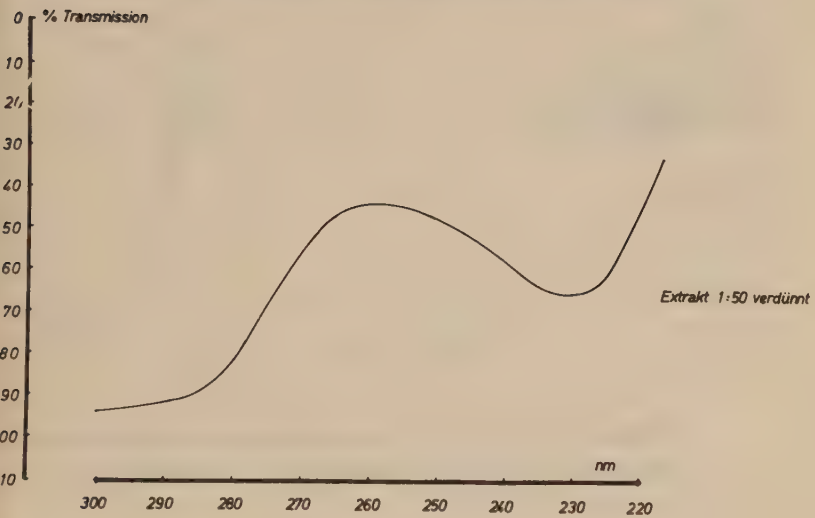


ABBILDUNG 1

T A B E L L E 1

Zeit in Std.	Beginn	$\frac{1}{2}$	1	2	3	4	5	
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%	
6mg Kochsaft/ ml	5	33	62	95	95	95	95	= 0,6%
10mg PCE/ml	5	10	16	82	90	91	91	= 1%
6mg PCE/ml	6	8	16	81	85	85	86	= 0,6%
2mg PCE/ml	5	8	15	66	75	74	73	= 0,2%
Kontrolle	5	6	6	10	12	15	16	

Wirkung verschiedener Perchlorsäureextraktkonzentrationen
gegenüber der optimalen Konzentration von Hefekochsaft
auf g r o ß e Zellen.

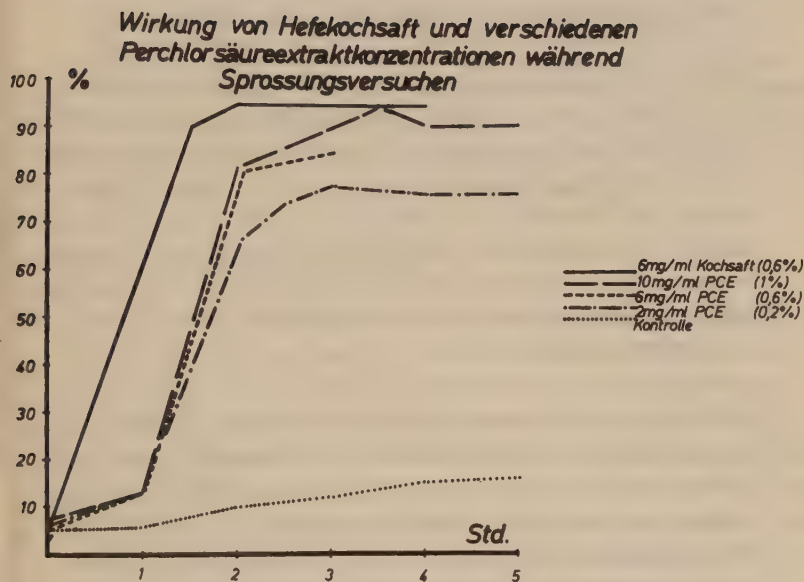


ABBILDUNG 2

Beeinflussung der Sprossung nach Zusatz verschiedener Konzentrationen des Perchlorsäureextraktes im Vergleich zur Wirkung von Hefekochsaft.

2.1.4. Trennungsversuche am Perchlorsäureextrakt ohne Säule

2.1.4.1. Vorfraktionierung des Perchlorsäureextraktes

Um bei der späteren säulenchromatographischen Trennung des Perchlorsäureextraktes eine möglichst schmale Zone auf die Säule auftragen zu können, wurde der mit KOH neutralisierte Extrakt im Rotationsverdampfer eingeeengt. Aus dem eingeeengten Extrakt gelang es, eine Reihe von Substanzen zu eliminieren.

Im Verlauf des Einengens bildeten sich nadelförmige Kristalle. Um die Natur dieser Kristalle kennenzulernen, wurde der Extrakt mit Silbernitratlösung versetzt. Es entstand ein schmutzigbrauner Niederschlag, während bei Zusatz von BaCl_2 keine Veränderung auftrat. Die Vermutung, es könne sich um Reste des bei der Neutralisation des Extraktes entstandenen Kaliumperchlorats handeln, konnte mit AgNO_3 und BaCl_2 nicht bestätigt werden, da sowohl Ag^+ -Ionen als auch Ba^{2+} -Ionen mit Kaliumperchlorat versetzt, zu keinem Niederschlag führten.

Mit Hilfe der Verbrennungssprobe konnte weiterhin gezeigt werden, daß das beim Einengen ausgefallene Substanzgemisch sowohl anorganische wie organische Anteile besaß. Während die organische Substanz verbrannte, blieb ein anorganischer weißer Rückstand. Er wurde systematisch auf Ionen des Nährsalzes und Kaliumperchlorat untersucht:

1) Nachweis des Perchloration

Die weiße kristalline Substanz wurde in einem Glühtiegel zu KCl verglüht (Disproportionierung), und diese wurde mit AgNO_3 als AgCl nachgewiesen.

2) Nachweis des Kalium

Charakteristische Flammenfärbung.

3) Nachweis des Natrium

Reste des aus dem Nährsalz stammenden Natrium (Natriumdihydrogensulfat-12-hydrat) konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

4) Nachweis der Citronensäure.

Die aus dem Nährsalz stammende Citronensäure konnte einmal als Niederschlag mit Barium-Acetat nachgewiesen werden, zum anderen kam es in der Wärme bei Zusatz von Kalziumoxyd zur Bildung von $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Durch den Vorgang des Einengens im Rotationsverdampfer ließen sich also weitgehend die leicht ausfallenden Fraktionen des Extraktes entfernen. Der klare Überstand wurde nach Zentrifugieren dekantiert und auf die Säule mittels einer Fingerpumpe kontinuierlich aufgepumpt. Wurde der Extrakt bis auf ca. 20 ml konzentriert, fiel eine amorphe Masse aus, die durch das Filter passierte. Wegen dieses Ausfalls unterblieb eine stärkere Einengung.

1.42. Fraktionierung nach STAS-OTTO.

Im Sprossungstest ließ sich aus der bisher beschriebenen Vorfraktionierung ableiten, daß die ausgefallenen Niederschläge nicht sprossungsanregend waren. Weiterhin wurde im Sprossungsversuch festgestellt, daß die gesamte wirksame Substanz in der wässrigen Phase verblieben war. (s. Tab. 2 und Abb. 3) Diese wässrige Phase wurde nun nach dem bekannten Analysengang nach STAS-OTTO aufgearbeitet. Der Analysengang unterscheidet mittels verschiedener Ausschüttelungsschritte zwischen hydrophilen und lipophilen Substanzen bei ansteigender pH Zuordnung (Darstellung s. exp. Teil 5.1.3.).

T A B E L L E 2

% Sprossung einer Hefezellpopulation nach Zusatz der im Analysengang nach STAS-OTTO ausgeschüttelten Substanzen, sowie der wässrigen Phase, des PCE, des Hefekochoaftes und der wässrigen Vorfraktion.

Zeit in Std.	Beginn	1	1 $\frac{1}{2}$	2	2 $\frac{1}{2}$	3	4	Zahl der Versuche
1. CHCl_3 -Iso- propanolphase	5	5	6	6	7	7	8	2
2. STAS-OTTO I Ätherphase	5	5	7	7	9	10	12	2
3. nachextr. CHCl_3 -Isopro- panolphase	5	6	7	7	10	8	10	2
4. weinsaure Chloroformphase	5	5	4	8	8	10	10	2
5. schwefelsaure Ätherphase	6	6	8	8	8	8	10	2
6. schwefelsaure Chloroformphase	5	7	8	8	10	9	11	2
7. saure Chloroformphase	7	6	7	8	8	7	9	2
8. Wässrige Phase	5	16	46	76	92	95	95	8
9. P C E	5	20	62	90	92	95	95	30
10. Kochsaft	5	65	77	90	95	95	95	50
11. Vorfraktion	5	52	67	79	85	92	95	2

**Sprossungsverlauf nach Zusatz der im Analysengang nach
Stas-Otto ausgeschüttelten Substanzen sowie der wässrigen
Phase**

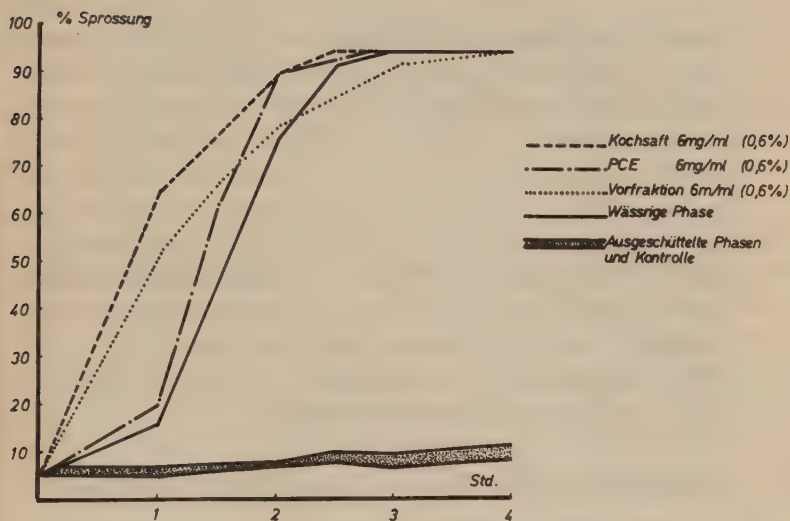


ABBILDUNG 3

2.1.4.3. Ergebnis des Untersuchungsganges nach STAS-OTTO

Die nach der Fraktionierung nach STAS-OTTO angefallenen Substanzmengen (Wirksubstanz) waren im Vergleich zu der im Ausgangsextrakt eingesetzten Trockensubstanz sehr gering (unter 1%). Somit verblieb die gesamte, nicht ausschüttelbare biologische Aktivität in der wässrigen Phase, die zur weiteren Aufklärung und Differenzierung der darin enthaltenen Stoffe an einen Anionenaustauscher adsorbiert wurde und mittels einer nachfolgenden Gradientenelution eluiert wurde.

Aus dem Sprossungsversuch (Abb. 3) geht hervor, daß die wässrige Phase und der Perchlorsäureextrakt, verglichen mit der Wirkung des Hefekochsaftes, die maximale Sprossungsrate von 95% erst nach $2\frac{1}{2}$ bis 3 Stunden erreicht. Während der Kochsaft nach einer Stunde bereits 65% der Zellen zum Sprossen brachte, beträgt der Prozentsatz gesprossener Zellen bei Perchlorsäureextrakt und wässriger Phase 15% bzw. 20%. Die wässrige Phase erreicht das Sprossungsmaximum bereits eine Stunde vor der zugesetzten Vorfraktion (s. 2.3.1.). Alle übrigen im Analysengang nach STAS-OTTO ausgeschüttelten Phasen liegen im Bereich der negativen Kontrolle, sind also sprossungsinaktiv. Das vermutlich in der CHCl_3 -Isopropanolphase ausgeschüttelte VIT- B_2 ist in Bezug auf die Sprossungsanregung ebenfalls negativ.

2.2. Säulenchromatographische Trennung des Perchlorsäureextraktes

Zur Auftrennung des Perchlorsäureextraktes bot sich wie bei WORTBERG⁽²¹⁾ die Säulenchromatographie an, da auf diese Weise der Extrakt in eine wasserlösliche Vorfraktion und eine säurelösliche Hauptfraktion getrennt werden konnte.

Während die wasserlösliche Vorfraktion in ihrer Gesamtheit in Sprossungsversuchen sprossungsanregende Wirkung auf Hefezellen zeigte, besaß bei den säurelöslichen Fraktionen lediglich eine Fraktion diese Eigenschaft. WORTBERG⁽²¹⁾ bezeichnete diese Fraktion, die noch ein Substanzgemisch darstellt, als Fraktion N IX (d.h. Nucleotidfraktion IX). Sie nimmt auf Grund ihrer biologischen Aktivität innerhalb der säurelöslichen Fraktionen eine

Sonderstellung ein und sollte daher mit Hilfe verschiedener Arbeitsgänge weiter aufgeklärt werden.

2.2.1. Apparatur zur Säulenchromatographie

Die Apparatur zur chromatographischen Trennung des Perchlorsäureextraktes (wässrige Phase) wurde in modifizierter Form den Arbeiten von HURLBERT⁽⁸⁾, STOSSEK⁽¹⁹⁾ und WORTBERG⁽²¹⁾ entnommen.

2.2.2. Vorbereitung der Säulen

Als Säulenmantel diente ein 126 cm langes Glasrohr mit einer lichten Weite von 30 mm, das am oberen Ende mit einem Schliffansatz versehen war. Als Füllmaterial wurde das stark basische Austauschharz DOWEX 1x8, mesh 200-400, x-10, Gegenion HCOO^- (Fa. SERVA) benutzt.

Um das Harz vor Gebrauch in die Formiatform zu bringen, wurde es zunächst mit 1n HCl regeneriert und anschließend mit Aqua demin. gewaschen, bis mit AgNO_3 keine Cl^- Ionen mehr nachzuweisen waren. Dann erneutes Waschen mit 1n NaOH und Nachwaschen mit Aqua demin. bis pH 7. Mit 1n HCOOH wurde das Harz daraufhin in die Formiatform gebracht. Der Überschuß der Ameisensäure wurde mit Aqua demin. herausgespült. Die Regeneration des Harzes wurde außerhalb der Säule in einem Rundkolben durchgeführt.

Zur Füllung der Säule wurde das DOWEX mit Aqua demin. aufgeschwemmt und die groben und feinen Partikel des Harzes mit Hilfe der Sedimentation getrennt. Vor Einfüllen wurde der Auslauf des Glasrohres mit einer Porzellanfritte und Watte abgedichtet, um das Mitreißen von DOWEX-Teilchen während der Elution zu verhindern.

Nach dem Waschen mit konzentrierter Ameisensäure zeigte der Durchlauf von der Säule bei neuverwendetem Harz eine leichte Gelbfärbung, die die Absorption des ultravioletten Lichtes beeinträchtigte. Daher wurden die Säulen vor dem Auftragen des Extraktes mit dem Mehrfachen ihres Bettvolumens an Aqua demin. durchspült, um noch adsorbierte Substanzen zu entfernen.

2.2.3. Auftragen des Extraktes

Die wässrige Phase des hergestellten Perchlorsäureextraktes wurde mittels einer Fingerpumpe über einen PVC-Schlauch von 1 mm Durchmesser auf die Säule aufgepumpt.

2.2.4. Apparative Anordnung zur Elution

Wässrige Vorfraktionen:

Zur Elution der wässrigen Vorfraktionen wurde mit Hilfe einer Fingerpumpe doppelt destilliertes Wasser (restliche CO_2 -Spuren entfernt) auf die Säule gepumpt, um diejenigen Verbindungen zu eluieren, die nicht durch Ionenaustausch auf der Säule festgehalten wurden. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt.

Säurelöslichen Fraktionen:

Die Elution der säurelöslichen Fraktion wurde mit einem Ameisensäure-Ammoniumformiatpuffer (s. exp. Teil 5.1.5.) durchgeführt. Die Geräte zur Gradientenelution bestanden aus einer 6 L Reservoirflasche, einem 2 L Mischgefäß (Rundkolben mit Magnetrührer), die als luftdichtes System mit der Säule über einen PVC-Schlauch von 1 mm Durchmesser in Verbindung standen. Die Elution wurde mit Wasser in der Mischflasche und dem konzentrierten Puffer in der Reservoirflasche begonnen. Um einen kontinuierlichen Anstieg des Gradienten im Mischgefäß zu gewährleisten, wurde mittels einer zwischen Mischgefäß und Säule geschalteten Fingerpumpe, innerhalb des geschlossenen Systems, der Inhalt des Mischgefäßes gleichmäßig auf die Säule gepumpt, während durch den im Mischgefäß entstehende Unterdruck konzentrierter Puffer aus der Reservoirflasche in die mit ihr verbundene Mischflasche nachfloß. Die Mischflasche enthielt zu Beginn der Elution 2000 ml doppelt destilliertes Wasser. Nähere Einzelheiten über Gradientenelution und Berechnung der Pufferkonzentration sind der Arbeit von GEISS⁽⁵⁾ zu entnehmen. Durch Vergrößerung des Volumens der Mischflasche konnte eine bessere Trennung der säurelöslichen Fraktionen erreicht werden.

2.2.5. Registrierung der Elutionskurve

Die eluierten Substanzen gelangten über einen PVC-Schlauch von 1 mm Durchmesser in eine Durchflußküvette von 1 cm Schichtlänge.

Die Extinktionsänderung wurde im Zeiss PMQ II bei einer Wellenlänge von 260 m μ gemessen und mit einem METRAWATT-SERVOGOR-Schreiber linear aufgezeichnet. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe eines automatischen Fraktionssammlers (LKB-Radic-Rac) aufgefangen und weiterverarbeitet.

Zur kontinuierlichen Messung wurde in späteren Versuchen als neues Gerät das Spektralphotometer PMQ II mit Spaltautomatik (Hundertpunktautomatik), sowie als Zusatzgerät eine Küvettenautomatik eingesetzt. Die Eluate wurden hiermit bei zwei verschiedenen Wellenlängen registriert, wobei nicht mehr die lineare Extinktion bei 260 m μ gemessen wurde, sondern der Transmissionsgrad bei 258,5 m μ (Maximum des UV-Spektrums des Perchlorsäureextraktes) und 280 m μ (s. Abb. 4). Für die automatischen Messungen bei zwei Wellenlängen wurde außerdem der Wellenlängenantrieb benötigt. Zur Aufzeichnung der Elutionsdiagramme diente der elektronische Kompensations-Mehrfach-Punktendrucker POLYCOMP. Die gewonnenen Fraktionen wurden wiederum mit Hilfe des LKB-Radic-Rac gesammelt und aufgearbeitet.

2.2.6. Elution

Die wässrigen Vorfraktionen konnten mit etwa 2-3 L doppelt destilliertem Wasser gut getrennt eluiert werden. Zur Elution der säurelöslichen Fraktionen wurden etwa 6-7 L Puffer benötigt, wobei die Elution nach Auffangen der gesuchten sprossungsanregenden Fraktion N IX (s. Sprossungsversuche) mit doppelt konzentriertem Puffer (s. exp. Teil 5.1.5.) fortgesetzt wurde. Um möglichst schnell Substanz der sprossungsaktiven Fraktion zu erhalten, wurde in weiteren Versuchen nur noch bis zu dieser Fraktion einschließlich eluiert und die restlichen Fraktionen durch Aufbringen von konzentriertem Puffer als Gesamteluat ausgetauscht und als (negative) Kontrolle im Sprossungstest eingesetzt.

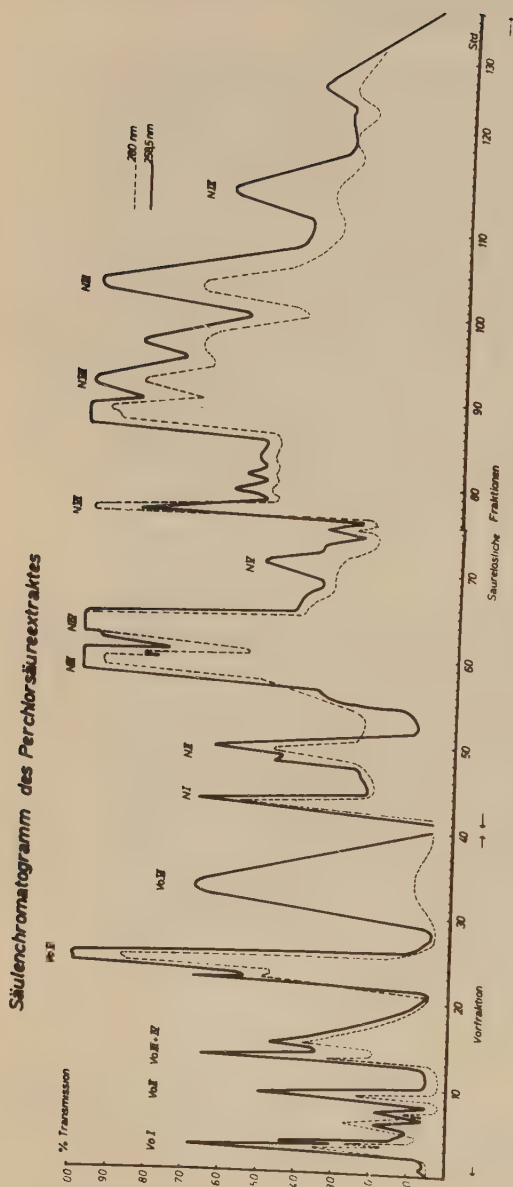


ABBILDUNG 4

2.2.7. Ergebnisse der Säulenchromatographie

Das Chromatogramm des Perchlorsäureextraktes läßt sich in eine wässrige Vorfraktion und eine säurelösliche Hauptfraktion trennen. Letztere wiederum wurde in zwei Anteile unterteilt, wobei der erste Teil bis zur Elution von Fraktion N IX einschließlich, mittels der Gradientenelution mit einfach konzentriertem Puffer in mehrere Fraktionen aufgetrennt wurde und die Elution des zweiten Teils mit doppelt konzentriertem Puffer durchgeführt wurde, bzw. als Gesamtfraktion auf der Säule ausgetauscht wurde.

Im Chromatogramm der wässrigen Vorfraktion konnten 8 - 10, im Chromatogramm der säurelöslichen Hauptfraktion 18 Peaks dargestellt werden, die reproduzierbar sind. Durch ein parallel registriertes Elutionsdiagramm einer anderen Säule konnte gezeigt werden, daß die eluierten Substanzmengen der einzelnen wässrigen Fraktionen nicht gleich waren, obwohl auf beide Säulen gleiche Extraktmengen aufgetragen worden waren. Die Erklärung ist vermutlich in den verschiedenen Lagerungszeiten der Extrakte zu suchen. Ein entsprechendes Phänomen war die Verminderung der integrierten Fläche einiger Peaks der säurelöslichen Fraktionen. Hier standen die Substanzen auf der Säule etwa sechs Tage unter Wasserdurchfluß, bevor die Pufferelution fortgesetzt wurde. Das Elutionsdiagramm zeigte also gewisse Schwankungen, die bei einer möglichen Substanzveränderung bzw. einem Substanzverlust auftreten können. Diese Erscheinung wurde auch bei längerer Lagerung von Extrakten in wässrigem Medium beobachtet. (Vergleichende Spektren von Extrakten verschiedenen Alters) Auf eine ähnliche Erscheinung eines Substanz- bzw. Wirksamkeitsverlustes verweist SCHLÜTER⁽¹⁷⁾.

Von Vorteil für die Reproduktion der Elutionsdiagramme war die Registrierung der Transmissionsgrade bei zwei verschiedenen Wellenlängen (258,5 m μ und 280 m μ). Es ergab sich meist eine schwächere Absorption der Meßwerte bei 280 m μ ; gelegentlich war umgekehrt die Absorption bei 280 m μ stärker als bei 258,5 m μ . Die Schnittpunkte der gezeichneten Kurven konnten dann als Fix- und Bezugspunkte gewählt werden (s. Abb. 4).

Die Elution der sprossungsanregenden säurelöslichen Fraktion erfolgte nach einem Pufferverbrauch von ca. 4.900 ml. Dies war ein Hinweis, daß es sich bei der gesuchten Substanz um eine starke Säure handeln muß, die

1. auf dem starksauren Anionenaustauscher haftet und adsorbiert wird,
2. nicht im Analysengang nach STAS-OTTO erfaßt werden kann und dort in der wässrigen Phase zurückbleibt,
3. erst bei erhöhter Ionenstärke und Acidität des Puffers von dem Austauschharz abgelöst wird.

2.3. Verarbeitung der Eluate nach Säulenchromatographie

2.3.1. Wässrige Vorfraktion

Die einzelnen wässrigen Fraktionen wurden als Gesamteluat im Rotationsverdampfer bei 35 - 40 C (Badtemperatur) eingeeengt und gefriergetrocknet. Die Trockensubstanz zeigte im Keimversuch deutliche Wirksamkeit (s. Keimversuche).

2.3.2. Säurelösliche Fraktionen

Die säurelöslichen Fraktionen wurden einzeln im Rotationsverdampfer möglichst weit eingeeengt, um die freie Ameisensäure abzdampfen und dann über einen Kationenaustauscher geschickt, um die aus dem Puffer stammenden NH_4 -Ionen auszutauschen. Als Austauscherharz wurde DOWEX (Type 50W x 8, mesh 20-50, Gegenion:Na) benutzt. Vor Gebrauch wurde das Harz mit 1n NaOH und 1n HCl regeneriert. Das nach dem Austausch erhaltene Eluat wurde mit NEALERS Reagens auf NH_4 -Ionen untersucht, nach negativem Ausfall der Probe bei 35 - 40 C auf etwa 10 - 20 ml eingeeengt und gefriergetrocknet. Um den Kontakt der sublimierenden Ameisensäure mit der Vakuumpumpe zu vermeiden, wurde ein Trockenturm von 20 cm Länge und 7 cm Innendurchmesser, gefüllt mit NaOH-Plätzchen und grober Glaswolle, zwischen Pumpe und Vakuumgefäß geschaltet. Eine Verringerung des Vakuums um eine Zehnerpotenz mußte dabei in Kauf genommen werden (WORTBERG⁽²¹⁾). Die erhaltenen Trockensubstanzen wurden auf ihre biologische Aktivität im Keimversuch getestet, bzw. zur weiteren Verwendung im Vakuum aufbewahrt.

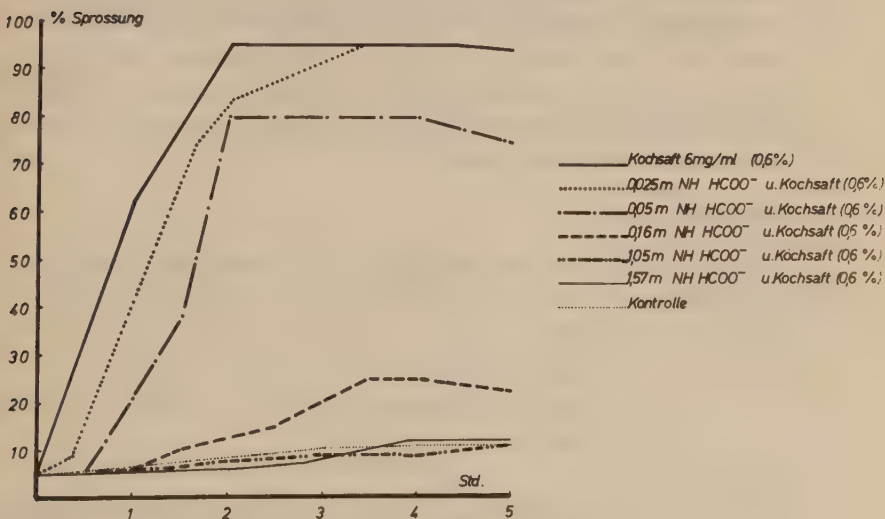
Die von WORTBERG⁽²¹⁾ während der Gefriertrocknung angewandte Infrarotbestrahlung der einzelnen Fraktionen wurde zunächst nicht durchgeführt, um eine mögliche Schädigung der sprossungswirksamen Substanz zu umgehen

Zudem tritt nach REIK⁽¹⁶⁾ eine Sublimation des Ammoniumformiats erst bei Temperaturen über 40 C ein, und erst Temperaturen bis zu 145 C gewährleisten die vollständige Entfernung des Ammoniumformiats. Da bei der weiteren Verarbeitung der gewonnenen Substanz die Temperatur von 40 C nicht überschritten werden sollte, bot sich im Verfahren des Kationenaustausches ein die Substanz schonendes Verfahren an.

2.3.3. Beobachtungen während der Eluatverarbeitung

Die Hitzeempfindlichkeit der sprossungswirksamen Substanzen im Perchlorsäureextrakt konnte nicht bestätigt werden, da ein auf ca. 100 C (Wasserbadtemperatur) im Rotavapor erhitzter Extrakt im Keimversuch volle biologische Aktivität aufwies. Der von WORTBERG⁽²¹⁾ erwähnte hemmende Effekt hoher Ammoniumformiatkonzentrationen auf die Sprossung von Hefezellen konnte nicht bestätigt werden (s. Sprossungsversuch Abb. 5).

Darstellung der Grenzkonzentration von Ammoniumformiat und seiner hemmenden Wirkung auf die Sprossung bei Zusatz von Kochsaft



Die Grenzkonzentration von zugesetztem Ammoniumformiat, das bei gleichzeitigem Zusatz von Hefekochsaft die Sprossung hemmt, liegt bei etwa $0,16 \text{ m NH}_4 \text{ HCOO}^-$. Hier wird nach $3 \frac{1}{2}$ Stunden eine Sprossung von 25% beobachtet. Um die normale Wirkung des Kochsaftes zu erreichen, muß die Konzentration des vorhandenen Ammoniumformiat unter $0,025 \text{ Mol/Liter}$ betragen.

2.4. Schichtchromatographie der Fraktion N IX

Mit Hilfe der Schichtchromatographie sollte die durch Säulenchromatographie gewonnene Fraktion N IX, die im Sprossungsversuch biologische Aktivität zeigte, weiter aufgetrennt werden. Hierzu wurden definierte Mengen an Trockensubstanz in Aqua demin. gelöst und mittels eines Sprüheräts (genaue Beschreibung s. WORTBERG⁽²¹⁾) strichförmig auf die Cellulose-Schicht-Platten aufgesprüht. Während des Besprühens wurde die Auftraglinie zugleich von einem Ventilator getrocknet.

2.4.1. Adsorptionsmittel

Als Adsorptionsmittel für die Schichtchromatographie diente MN-300-Cellulose (Fa. Machery & Nagel), von der zur Herstellung einer Schichtplatte (20 x 20 cm) 8g in 50 ml Wasser aufgeschlemmt, mit Hilfe des Ultraturrax gut durchmischt und nach Entfetten der Platten mit Aceton, mit der Hand aufgetragen wurden. Die Schichtdicke der Platten betrug etwa 1 mm. Die Platten wurden bei Raumtemperatur vorgetrocknet und dann 30 Minuten bei 60 C im Trockenschrank gelagert. Die gebrauchsfertigen Platten wurden bis zur weiteren Verwendung in einem Exsiccator im Vakuum aufbewahrt.

2.4.2. Fließmittel

Zur Trennung der säurelöslichen Fraktion N IX wurde das Fließmittel nach MICHELSON⁽¹¹⁾ und RANDERATH^(14,15) benutzt, das folgende Zusammensetzung aufweist:

Amylenhydrat	3	
konzentrierte Ameisensäure	2	Laufzeit 6-7 Std.
Wasser	1	

Die Platten wurden nach Entnahme aus der Fließkammer über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und unter einer UV-Lampe bei den Wellenlängen 254 mμ und 366 mμ betrachtet.

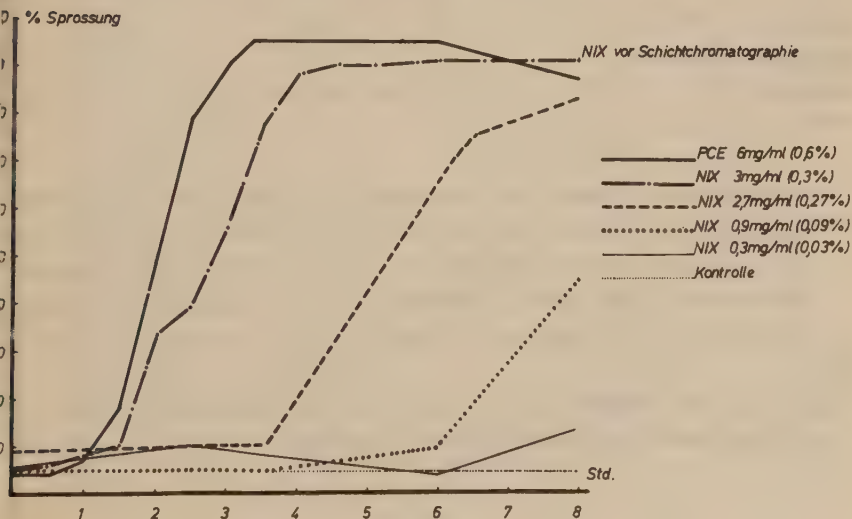
2.4.3. Aufarbeiten der Substanzen nach Schichtchromatographie

Die getrennten Banden wurden einzeln von der Platte entfernt, in 5 ml Aqua demin. gelöst und eine Stunde auf einem Magnetrührer gebracht, im Kühlraum (2 C7 über Nacht aufbewahrt, um die Sedimentation der Cellulose-Teilchen zu begünstigen. Sodann wurde 2x bei 3500 x h zentrifugiert und der Überstand, der die wirksamen Bandensubstanzen enthalten mußte, in Sprossungsversuchen getestet. Um die für den betreffenden Sprossungstest gewünschte Konzentration der zu untersuchenden Substanz zu erhalten, mußten die Bandeneluate teilweise im Rotationsverdampfer eingeengt werden.

2.4.4. Ergebnisse der Schichtchromatographie

Nach schichtchromatographischer Behandlung der Fraktion N IX zeigte sich beim Einsetzen im Wachstumsversuch eine eindeutige zeitliche Verschiebung der eintretenden Wirkung auf die Sprossung, die gegenüber nicht behandelter Substanz etwa $2\frac{1}{2}$ Stunden

Sprossungsverlauf nach Zusatz verschiedener Konzentrationen der Fraktion NIX nach schichtchromatographischer Behandlung



ausmachte und im Vergleich zum Perchlorsäureextrakt etwa 3 Stunden (s. Tab. 3 und Abb. 6).

T A B E L L E 3

% Sprossung einer Hefezellpopulation nach Zusatz verschiedener Konzentrationen der Fraktion N IX nach schichtchromatographischer Behandlung (Gesamtansatz: 3 ml 0,3%ige Hefesuspension).

Auf die Platten wurden 40 mg Substanz von N IX aufgetragen. Ein Viertel der Platte wurde eluiert mit 10 ml Aqua demin. d.h., in 1 ml waren 1 mg Fraktion N IX enthalten. Zum Vergleich wurden Proben mit der Gesamtfraktion N IX, die nicht schichtchromatographisch behandelt war, sowie mit Perchlorsäureextrakt eingesetzt.

Zeit in h	Beginn	$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	$2\frac{1}{2}$	3	$3\frac{1}{2}$	4	5	6	$6\frac{1}{2}$	8	Zahl der Versuche
% Sprossung		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
2,7mg Eluat	9	8	6	6	6	10	10	10	19	42	66	75	83	2
0,9mg Eluat	5	5	5	6	5	6	6	5	7	11	9	20	45	2
0,3mg Eluat	7	7	8	7	9	10	10	8	7	7	4	4	12	2
P C E	4	4	7	18	51	79	90	95	95	95	95	95	95	
negative Kontrolle	7	7	6	6	7	6	7	6	5	5	7	8	7	
N IX Gesamtfraktion	5	6	8	10	33	38	56	77	88	90	90	91	90	10

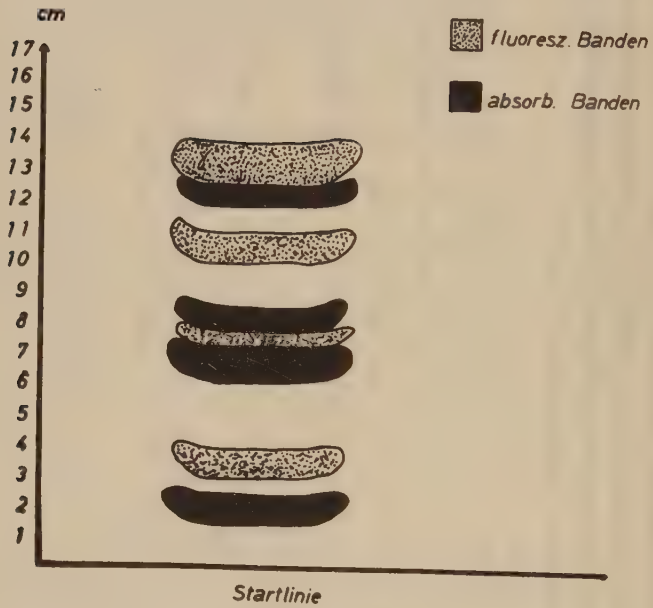
Eine ausreichende Trennung der Fraktion N IX war mit Hilfe der Schichtchromatographie nicht zu erzielen. Bei der Betrachtung im UV-Licht waren zwar optisch verschiedene Farbflecke zu unterscheiden, jedoch im Sprossungsversuch zeigten sowohl absorbierende als auch fluoreszierende Banden (WORTBERG⁽²¹⁾) Sprossungswirksamkeit (s. Tab. 4 und Abb. 7 und 8).

Die zeitliche Differenz der im Wachstumsversuch eintretenden Wirkung von fluoreszierenden und absorbierenden Banden war unerheblich (s. Abb. 8).

% Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz der säurelöslichen Fraktion N IX (30 mg) und der schichtchromatographisch aufgetrennten Banden. (Gesamtansatz 0,5 ml)
Die getrennten Banden wurden in eine obere (C + D) und eine untere Hälfte (A + B) aufgeteilt (1).
Diese wurden wiederum in eine absorbierende (3) und fluoreszierende (2) Bande eingeteilt (s. Abb. 7).
und diese in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt.

Zeit in Stunden	Beginn	1/2	1	1	1/2	2	2	1/2	3	3	1/2	4	4	1/2	6	Zahl der Versuche
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	
0,45 ml Bd.-Eluat	7		6	7		12	58	60	60	64	70	73	80			5
N IX (A + B)																
0,45 ml Bd.-Eluat		5	10	10	16	16	16	16	17	17	18	19	45	47		5
N IX (C + D)																
N IX fluoresz.																
0,45 ml Eluat	6		8	10	10	7	7	66	78	79	80	80				5
N IX absorb.																
0,45 ml Eluat	8		7	11	15	10	10	80	80	85	90	95				5
N IX fluoresz.																
0,2 ml Eluat	10		9	10	11	12	20	44	57	68	72	80				5
N IX absorb.																
0,2 ml Eluat	8		9	8	8	8	10	16	17	22	53	69				5

Schichtchromatogramm der Fraktion NX



Sprossungsverlauf nach Zusatz von Bandeneluat der Fraktion NIX nach Schichtchromatographie

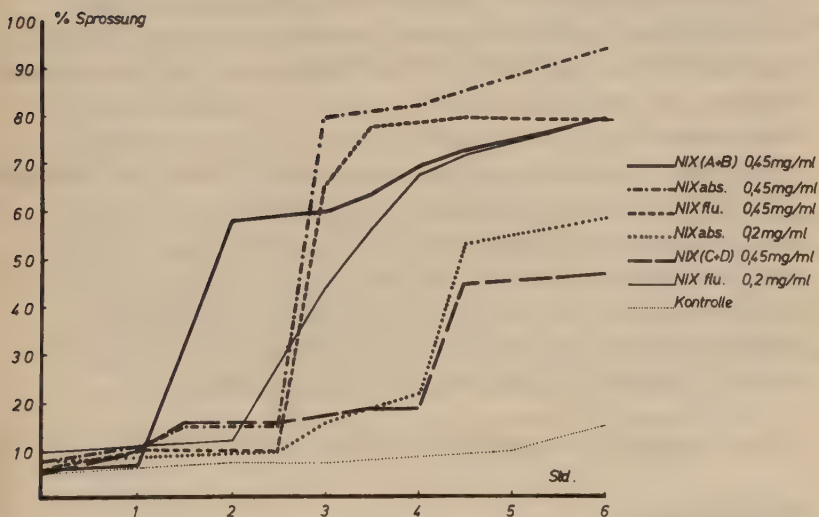


ABBILDUNG 8

2.5. Rechromatographie der Fraktion N IX

2.5.1. Gelfiltration an Sephadex G-10

Da mit Hilfe der Schichtchromatographie keine ausreichend exakte Trennung der Fraktion N IX zu erreichen war, sollte mit Hilfe der Gelfiltration an Sephadexsäulen versucht werden, das vorliegende Substanzgemisch weiter zu analysieren (GELOTTE⁽⁶⁾).

Alle Sephadextypen sind quervernetzte Dextrane; sie bestehen somit aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Polysaccharidketten.

Im chromatographischen Prozess der Gelfiltration werden Größenunterschiede zwischen verschiedenartigen Molekülen zu ihrer Trennung ausgenutzt. Schematisch läßt sich eine Trennung wie folgt beschreiben: Moleküle, die größer als die Poren im vernetzten Dextran sind, die also oberhalb seiner Ausschlußgrenze liegen, dringen in das dreidimensionale System nicht ein und wandern daher stets in der Lösungsphase außerhalb der Partikel durch die Säulenfüllung. Sie werden somit zuerst eluiert. Kleinere Moleküle hingegen dringen in einem von ihrer Größe und Affinität zum Dextranmolekül abhängigen Maß in die Gelpartikel ein. Sie wandern daher verzögert durch die Sephadexfüllung und werden in Reihenfolge abnehmender Molekülgröße eluiert (Sephadex-Gelfiltration in Theorie und Praxis⁽¹³⁾).

In der vorliegenden Versuchsreihe wurde mit Sephadex G- 10 gearbeitet:

Technische Daten

Typ	Fraktionierbereich Mol.-	Wasseraufnahme- vermögen ml/ g trockenes Seph.	Bettvolumen ml/ g trockenes Seph.	Teilchengröße Mikron
Sephadex G- 10	bis ca. 700	1,0 ± 0,1	2-3	40-120

Um eine Probe wirksam aufzutrennen, ist der Gelyp zu wählen, in dessen Fraktionierungsbereich die interessierenden Komponenten fallen. Da im vorliegenden Fall eine biologische Flüssigkeit zu untersuchen war, ließen sich die Bestandteile nicht in einem einzigen Prozess isolieren. Daher sollte die Gelfiltration mit einer anderen Methode kombiniert werden. Dabei sollte natürlich das Trennprinzip der zweiten Methode

nicht auf der Molekülgröße bestehen, sondern nach anderen Parametern differenzieren. In Betracht kam die Dünnschichtchromatographie, da hier mit geringsten aufgetragenen Substanzmengen gute Trennungen erreicht werden können.

Einen weiteren Vorteil der Gelfiltration stellt die Möglichkeit zur Entsalzung der aufzutrennenden Probe dar. Das Entsalzen steht in diesem Zusammenhang nicht allein für das Entfernen von Salzen, sondern umfaßt auch das Abtrennen anderer niedermolekularer Verbindungen aus Lösungen makromolekularer Stoffe (Pharmacia GmbH⁽¹³⁾). Im vorliegenden Fall sollte in Betracht gezogen werden, auf Grund dieser Trenntechnik, Reste der verbliebenen Ammoniumionen aus der Fraktion N IX zu entfernen, bzw. das Verfahren am Kationenaustauscher zu umgehen und mittels der Gelfiltration weitgehend alle NH_4 -Ionen der Elutionsflüssigkeit zu eliminieren.

5.1.1. Vorbereitung des Gels

Sephadex G-10 wurde zunächst unter Rühren in reichlich Wasser suspendiert, die feinen Partikel im Überstand abdekantiert und blieb bis zum vollständigen Durchquellen stehen. Die Mindestquellzeit bei Raumtemperatur betrug drei Stunden. Da sich beim Packen der Säulenfüllung leicht Blasen bilden, die zu ungleichmäßigem Durchfluß und schlechten Trennungen führen, wurden Entgasungen in der Säule dadurch vermieden, daß das Gel kurz vor dem Einfüllen im Wasserstrahlvakuum entlüftet wurde.

5.1.2. Trennsäule

Die verwendeten Säulen hatten die Maße 1,5 x 200 cm. Als Träger der Säulenfüllung wurde ein Wattepfropf benutzt, der nur einen geringen Durchflußwiderstand darstellte und während der Trennung nicht verstopfen konnte. Das Gel wurde in dickflüssiger Form unter geöffnetem Säulenablauf eingefüllt und die fertig gepackte Säule zur Stabilisierung der Gelfüllung noch einige Zeit mit dem Trennmedium Wasser vorgespült, mindestens jedoch mit dem dreifachen Volumen der Säulenfüllung.

5.1.3. Auftragen der Probe

Die zu trennende säurelösliche Fraktion N IX wurde auf folgende Weise auf die Säulenfüllung aufgetragen: Zunächst wurde die Hauptmenge des Flüssigkeitsüberstandes abgehebert. Den Rest konnte man durch Öffnen

des Auslaufes eben in die Gelfüllung einsickern lassen. Bei geschlossenem Auslauf wurde die Lösung mit einer Pipette auf die Geloherfläche geschichtet und der Auslauf solange geöffnet, bis die Probe gerade eingezogen war. Mit etwas Wasser wurde die Geloherfläche und die mit der Probe in Kontakt gekommene Rohrwand nachgewaschen und der Auslauf bis zum Einziehen der Waschflüssigkeit geöffnet. Schließlich wurde der freie Säulenteil mit Elutionsmittel (H_2O) aufgefüllt, der Zulauf mit dem Elutionsmittelreservoir verbunden und der Auslauf geöffnet. Die Startzone wurde so schmal wie möglich gehalten. Dazu wurde das Volumen der Fraktion so klein gewählt, daß eben noch eine gleichmäßige Verteilung über den gesamten Gelquerschnitt gewährleistet war.

2.5.1.4. Elutionsmittel

Als Elutionsmittel wurde doppelt destilliertes Wasser benutzt. Bei der Gelfiltration lassen sich Neutralkmoleküle ohne weiteres mit destilliertem Wasser eluieren. Werden dagegen Stoffe chromatographiert, die Ionengruppen tragen, dann ist es günstiger, mit einem Eluanten zu arbeiten, dessen Ionenstärke mindestens 0,02 beträgt. Der Grund ist darin zu suchen, daß Sephadex eine geringe Zahl von Carboxylgruppen enthält, die andernfalls eine minimale Adsorption der Kationen bzw. einen geringen Ausschlußeffekt von Anionen bewirken. Auch ionisierte Verbindungen können mit destilliertem Wasser eluiert werden, z.B. bei einem Entsalzungsprozess, der im vorliegenden Versuch zur Entfernung der NH_4 -Ionen aus der Fraktion N IX durchgeführt werden sollte. Eine vollständige Entsalzung war dann zwar nicht zu erzielen, aber der Anteil, der mit einer hochmolekularen Fraktion die Säule verlassenden Ionen war so gering, daß er zu vernachlässigen war (Prüfung mit NEBLERS Reagens).

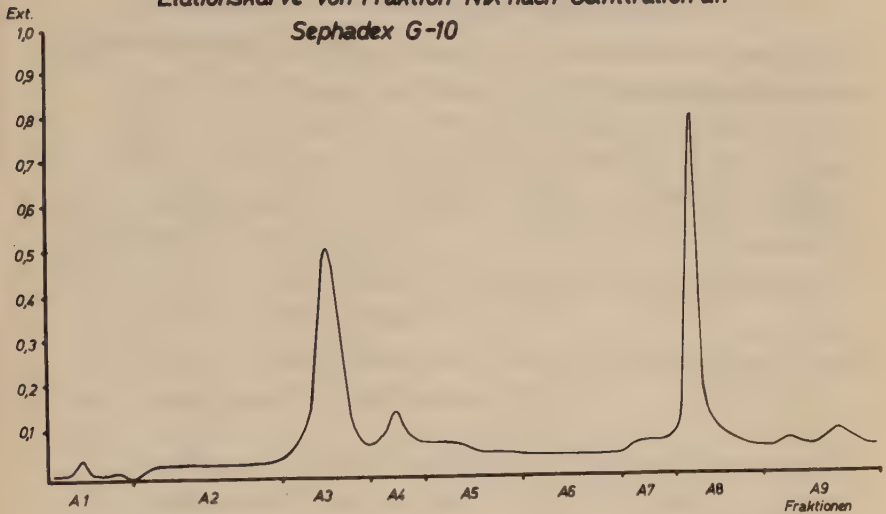
2.5.1.5. Registrierung und Einteilung des Elutionsdiagrammes

2.5.1.6. Wachstumsversuche

Die eluierten Substanzen gelangten nach dem Säulendurchlauf über einen PVC-Schlauch von 1 mm Durchmesser in eine Durchflußküvette von 1 cm Schichtlänge. Die Extinktionsänderung des Eluates wurde im ZEISS PNQII bei 260 mμ gemessen und mit einem METRAWATT-SERVOGOR-Schreiber linear aufgezeichnet (s. Abb. 9). Die einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe des automatischen Fraktionssammlers aufgefangen und

mit NEBLERS Reagens auf Ammoniumformiat geprüft. Die gesamte Elutionskurve wurde in verschiedene Abschnitte (A1-A9) eingeteilt (s. Abb. 9) und die entsprechenden Eluate bis zur Trockne

*Elutionskurve von Fraktion NIX nach Gelfiltration an
Sephadex G-10*



A B B I L D U N G 9

eingengt. Sie wurden im Sprossungstest auf biologische Wirksamkeit untersucht. (s. Ergebnisse und Tab. 5) Der mit Hilfe der Gelfiltration unternommene Versuch zur vollständigen Entsalzung der Fraktion N IX von Ammoniumionen war nur teilweise erfolgreich.

2.5.1.7. Ergebnisse der Gelfiltration

Bei der Gelfiltration der Fraktion N IX an Sephadex G-10 konnte eine Elutionskurve (s. Abb. 9) bei 260 mμ registriert werden, die zwei große charakteristische und mehrere kleine Peaks aufweist, die reproduzierbar sind. Die Einteilung der Kurve in neun Abschnitte war

Sprossungstest zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, daß die biologische Wirksamkeit nicht auf einen bestimmten Abschnitt des Elutionsdiagramms zu beziehen war, sondern daß die Abschnitte A3, A4, A7, A8 und A9 sprossungsanregende Stoffe enthielten. Lediglich die Fraktionen A5 und A6 zeigten im Sprossungstest keinerlei Wirkung. Sie entsprechen dem tiefsten Abschnitt der Elutionskurve (Vergl. Abb. 9 und Tab. 5).

T A B E L L E 5

% Sprossung bei Hefezellen (5,5 u) nach Zugabe der durch Gelfiltration erhaltenen Fraktionen A1- A9.

Zeit in Stunden	Be- ginn	1	2	3	4	5	6
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%
A 1	5	9	61	65	55	55	55
A 2	6	10	15	32	48	52	59
A 3	6	9	32	44	45	50	70
A 4	6	10	42	56	60	62	86
A 5	6	11	13	12	12	18	20
A 6	6	12	13	16	20	24	20
A 7	6	5	11	30	42	62	85
A 8	5	6	15	42	49	63	80
A 9	8	17	62	65	65	65	60

Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei der gesuchten Substanz um einen Stoff handelt, der bei Gelfiltration mit Aqua demin. als Elutionsmittel auf der Elutionskurve nicht lokalisierbar ist und während des chromatographischen Prozesses mitschmiert. Die Gelfiltration mit Wasser als Elutionsmittel ist in diesem Falle nur von Nutzen zur weiteren Reinigung der Fraktion N IX. Es ist zu überlegen, ob die Anwendung eines Puffers als Elutionsmittel zu einem vorteilhafteren Ergebnis führen kann.

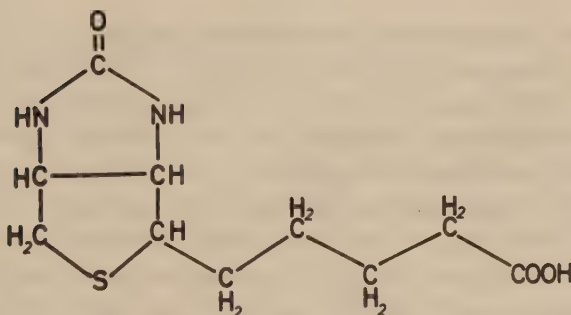
2.6. Darstellung des sprossungsaktiven Wirkstoffes

2.6.1. Hinweise zur Identifizierung der Fraktion N IX

Auf Grund der oben beschriebenen Versuche und ihrer Ergebnisse lassen sich folgende Hinweise auf den sprossungsanregenden Wirkstoff zusammenfassen:

1. Bei der gesuchten Substanz muß es sich um einen thermostabilen Stoff handeln.
2. Die Fraktionierung nach STAS-OTTO sowie die Adsorption an einem stark sauren Ionenaustauscher und die Elution mit Ammoniumformiatpuffer beweisen, daß es sich um eine stärkere Säure handeln muß.
3. Weiterhin wurde in einer reinen Fraktion N IX Schwefel nach LAISSEIGNE nachgewiesen.
4. Es wurde im UV- als auch im sichtbaren Bereich kein charakteristisches Spektrum gefunden.
5. Verlust der biologischen Aktivität nach Bestrahlung mit UV-Licht deuten auf die UV-Empfindlichkeit hin.

Diese Tatsachen weisen daraufhin, daß es sich bei dem gesuchten sprossungsaktiven Wirkstoff um Biotin handeln könnte, da es



BIOTIN

gleiche physikalische und chemische Eigenschaften besitzt und als Hefewachstumsfaktor bekannt ist (FIESER⁽⁴⁾) (s. Abb. 10).

2.6.2. Biologische Beweisführung

Als parallele Beweisführung zum chemischen Beweis der Identität von Fraktion N IX mit Biotin sollte mit Hilfe der Wachstumsversuche gezeigt werden, daß beide Substanzen in ihrer Wirkung auf sprossungsbereite Hefezellen einander entsprechen.

2.6.2.1. Vergleich der Wirkung von N IX und D(+) Biotin

In Sprossungsversuchen mit kleinen Zellen (hergestellt nach STOSSEK⁽¹⁹⁾) und großen Zellen wurden Fraktion N IX, die durch mehrfachen Kationenaustausch frei von NH_3 -Ionen war und reines D(+)-Biotin (Krist.: $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$) in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (s. Tab. 6 und 7).

Fraktion N IX wurde als Trockensubstanz eingewogen, während das im Handel erhältliche D(+)-Biotin auf der Mikrowaage abgewogen, in H_2O und der notwendigen Menge 0,1n NaOH gelöst und auf 1 ml Gesamtansatz ergänzt wurde. Die Versuchsanordnung der Keimversuche wurde beibehalten (s. exp. Teil 5.4.). Die verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen sind den Tabellen 6 und 7 zu entnehmen.

In den anschließenden Sprossungsversuchen wurde auch die Wirkung von Biotin auf kleine Zellen (STOSSEK⁽¹⁹⁾) untersucht, um hiermit ein Zellmaterial zu testen, bei dem eine gelegentlich vorkommende Spontansprossung von Einzelzellen mit Sicherheit auszuschließen war. Spontansprossung wurde gelegentlich in Wintermonaten bei großen Kontrollzellen beobachtet. Außerdem konnte angenommen werden, daß die sog. kleinen Zellen in ihrer Stoffwechselkonstellation noch nicht so weit entwickelt waren, daß eine Sprossung hätte einsetzen können. Hierzu müssen sie nach STOSSEK⁽¹⁹⁾ zu einer bestimmten Größe heranwachsen. Jedoch konnte nach einem mehrstündigen Belüftungsvorgang ohne Zusatz von Nährstoffen gezeigt werden (s. oben 2.6.2.2.), daß auch die kleinen Zellen Sprossen bilden können, ohne selbst an Volumen wesentlich zugenommen zu haben.

T A B E L L E 6

% Sprossung von großen Zellen (5,5 u) nach Zusatz
verschiedener Biotinkonzentrationen.

<u>Zeit in Std.</u>	<u>Beginn</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>2 $\frac{1}{2}$</u>	<u>4</u>	<u>Zahl der Versuche</u>
<u>% Sprossung</u>	<u>%</u>	<u>%</u>	<u>%</u>	<u>%</u>	<u>%</u>	
<u>Kochsaft</u>	5	56	95	95	95	
<u>neg. Kontrolle</u>	6	6	8	9	10	
<u>1 mg/ml</u>	7	12	74	86	95	10
<u>0,1 mg/ml</u>	7	8	76	82	95	10
<u>10⁻² mg/ml</u>	7	10	68	76	90	10
<u>10⁻³ mg/ml</u>	8	10	70	78	95	10
<u>10⁻¹ /ml</u>	6	3	52	70	90	5
<u>10⁻² /ml</u>	5	10	74	80	90	5
<u>10⁻³ /ml</u>	5	9	68	84	95	5
<u>10⁻⁴ /ml</u>	4	9	56	76	95	5
<u>10⁻⁵ /ml</u>	7	8	42	68	95	5
<u>10⁻⁶ /ml</u>	8	14	62	84	90	5
<u>10⁻⁷ /ml</u>	5	11	46	72	70	5

T A B E L L E 7

% Sprossung von großen Zellen (5,5 u) nach Zusatz
verschiedener Konzentrationen der Fraktion N IX pro
Milliliter.

<u>Zeit in Std.</u>	Beginn	2	$2 \frac{1}{2}$	4	Zahl der Versuche
<u>% Sprossung</u>	%	%	%	%	
<u>Kochsaft</u>	5	95	95	95	
<u>neg. Kontrolle</u>	5	6	7	7	
<u>N IX 3,3 mg/ml</u>	6	76	90	95	10
<u>N IX 60 /ml</u>	5	84	95	95	10
<u>N IX 6,0 /ml</u>	4	95	95	95	10
<u>N IX 0,6 /ml</u>	5	95	95	95	10
<u>$6 \cdot 10^{-3}$ /ml</u>	6	22	28	44	10
<u>$6 \cdot 10^{-4}$ /ml</u>	5	7	8	7	10
<u>$6 \cdot 10^{-5}$ /ml</u>	3	6	5	6	10
<u>$6 \cdot 10^{-6}$ /ml</u>	3	4	6	7	10

2.6.2.2. Ergebnisse des Wirkungsvergleichs von N IX und Biotin an kleinen und großen Zellen

Es zeigte sich, daß eine Konzentration von 10^{-7} pro Milliliter bei einer 0,01%igen Hefesuspension (große Zellen von durchschnittlich 5 u) 70% der Zellen nach zwei Stunden zum Sprossen bringen. Nach Zugabe von $6 \cdot 10^{-3}$ pro Milliliter von Fraktion N IX wird nach vier Stunden noch eine Sprossung von 44% erreicht. Geringere Konzentrationen von Fraktion N IX zeigten im Sprossungstest keine Wirkung mehr (Vergl. Tab. 6 und 7).

Kleine Zellen nach STOSSEK⁽¹⁹⁾ werden von Biotin nicht zum Sprossen angeregt (s. Tab. 8).

T A B E L L E 8

Wirkung von Biotin auf kleine Zellen (Hergestellt nach STOSSEK⁽¹⁹⁾).

<u>Zeit in Std.</u>	<u>Beginn</u>	<u>2</u>	<u>2 $\frac{1}{2}$</u>	<u>4</u>
<u>% Sprossung</u>	<u>%</u>	<u>%</u>	<u>%</u>	<u>%</u>
<u>10 / 1 ml</u>	2	5	8	10
<u>1 / 1 ml</u>	1	3	2	5
<u>10^{-1} / 1 ml</u>	0	2	2	4
<u>10^{-2} / 1 ml</u>	0	1	1	2
<u>10^{-3} / 1 ml</u>	0	0	1	1
<u>10^{-4} / 1 ml</u>	4	5	6	10
<u>10^{-5} / 1 ml</u>	3	3	4	5
<u>10^{-6} / 1 ml</u>	3	2	4	3
<u>10^{-7} / 1 ml</u>	2	2	2	3
<u>Kontrolle</u>				
<u>Kochsaft</u>	12	46	78	90
<u>Kontrolle</u>	8	6	8	10

Werden diese aber in physiologischer NaCl-Lösung suspendiert und zwei Stunden vorbelüftet, so läßt sich zeigen, daß die Zellen bei Zusatz von 1 Biotin bereits reagieren (20 - 25% Sprossung). Nach fünfständiger Belüftung wird sogar eine Sprossungsrate von 50% erreicht (s. Abb. 11 und Tab. 9).

T A B E L L E 9

Wirkung von 1 Biotin pro Milliliter nach verschieden langer Vorbelüftung kleiner Zellen in physiologischer NaCl.

<u>Zeit in Std.</u>	<u>Beginn</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
<u>% Sprossung</u>	<u>%</u>	<u>%</u>	<u>%</u>	<u>%</u>	<u>%</u>	<u>%</u>	<u>%</u>
1 Std. vorbe- lüftete Zellen	3	5	6	7	8	8	10
2 Std. vorbe- lüftete Zellen	4	5	5	10	20	25	25
3 Std. vorbe- lüftete Zellen	4	6	6	8	22	26	29
4 Std. vorbe- lüftete Zellen	5	7	7	10	26	30	38
5 Std. vorbe- lüftete Zellen	4	6	9	17	31	45	50

Wird im Sprossungsversuch mit kleinen Zellen 1mg/ml lyophilisierte Substanz der Fraktion VoV zugesetzt, so erreichen diese nach vier Stunden eine Sprossungsrate von 65%, während 100 Biotin, unter gleichen Umständen zugesetzt, eine Sprossungsrate von etwa 28% erreichen lassen.

Nun geht aus Tabelle 6 und Abbildung 12 hervor, daß selbst maximale Biotinkonzentrationen bei kleinen Zellen nicht die Wachstumsrate wie bei Zusatz des Hefekochsaftes erreichen. Folglich muß ein zweiter Stoff, der in der wässrigen Vorfraktion enthalten ist (s. WORTBERG⁽²¹⁾), die Sprossung bei sprossungsbereiten Zellen spontan auslösen. Biotin

selbst katalysiert in geringen Konzentrationen auch ohne diesen Faktor den ablaufenden Sprossungsvorgang, jedoch tritt die Sprossung ca. eine Stunde später ein (s. Abb. 12 und Tab. 6).

**SPROSSUNGSVERLAUF KLEINER ZELLEN NACH ZUSATZ VON
BIOTIN UND AVIDIN SOWIE DES DENATURIERTEN BIOTIN-
AVIDINKOMPLEXES**

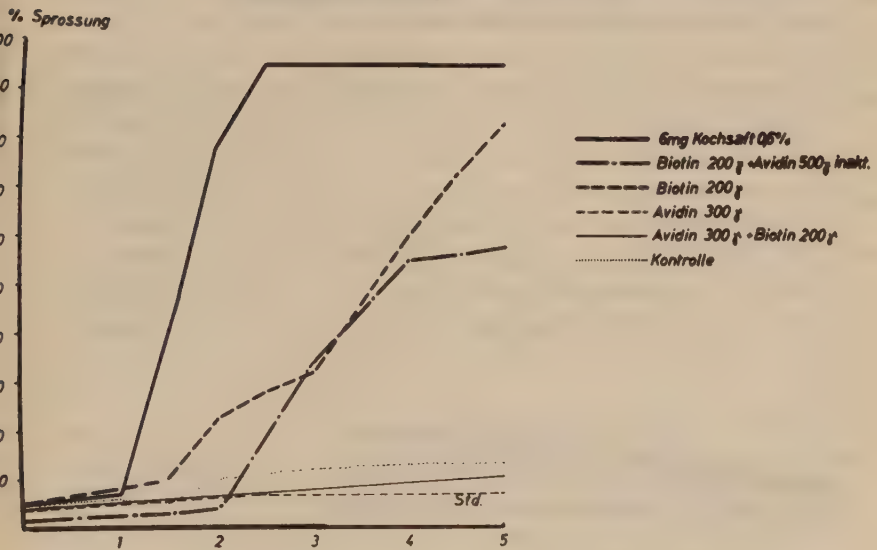
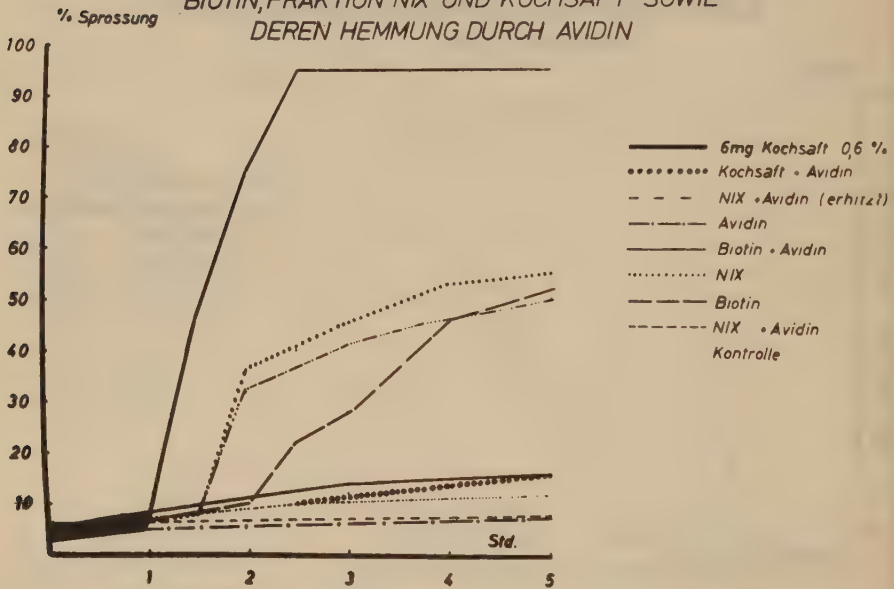


ABBILDUNG 11

SPROSSUNGSVERLAUF KLEINER ZELLEN NACH ZUSATZ VON
BIOTIN, FRAKTION NIX UND KOCHSAFT SOWIE
DEREN HEMMUNG DURCH AVIDIN



2.6.3. Biologischer Nachweis der Identität des Biotin mit der Fraktion N IX (Versuche mit Avidin)

Biotin wird durch ein spezifisches Protein des Eiklars, das Avidin, fest gebunden und dadurch inaktiviert. Avidin wird durch Erhitzen denaturiert und damit inaktiviert (KARLSON⁽¹⁰⁾). Im Parallelversuch sollte daher die biologische Wirkung von Biotin und Fraktion N IX durch Zusatz entsprechender Avidineinheiten blockiert werden (HERTZ⁽⁷⁾). Weiterhin sollte geprüft werden, ob durch Erhitzen des entstandenen inaktiven Biotin-Avidin- bzw. N IX-Avidin-Komplexes nach Denaturierung von Avidin die Sprossungsaktivität der inaktiv gebundenen Substanz wiederherzustellen ist. In Sprossungstesten wurde mit kleinen Zellen, die fünf Stunden in physiologischer Kochsalzlösung vorbelüftet waren (s. 2.6.2.2.), gearbeitet. Diese Abweichung von der sonst angewandten Versuchsanordnung bezog sich auf eine speziell vorbereitete Hefe: Da im Verlaufe der Arbeit große Unterschiede in der Sprossungsbereitschaft großer Zellen festgestellt wurden, einerseits in Sommermonaten (Juli/August) und in Wintermonaten (Januar/Februar), waren wir gezwungen, einen Sprossungszustand zu finden, der gewährleistete, daß eine Spontansprossung bei den Kontrollen vor Ablauf von sechs Stunden nicht eintrat (Maximale Sprossungsrate 20%). Gut sprossungsbereite Zellen wurden in den Monaten April und Mai beobachtet.

Da die Zellen der Wintermonate eine Spontansprossung der Kontrollzellen nach bereits $1\frac{1}{2}$ Stunden zeigten (über 20%), verwendeten wir kleine Zellen (3 u), die fünf Stunden in physiologischer NaCl-Lösung bei 30 C vorbelüftet wurden. Diese Zellen zeigten annähernd gleiche Eigenschaften wie die normalen sproßbereiten großen Zellen (ca. 5 u).

Der Vorteil, der in der Verwendung solcher Zellen lag, bestand einmal in ihrer gleichen Größe und zum anderen in ihrer weitgehend synchronen Stoffwechselsituation, deren Stadium für die Katalyse durch Biotin bzw. Fraktion N IX wesentlich war. Bei dem Hemmversuch mit Avidin erfolgte die Denaturierung der Avidinkomplexe mit Biotin bzw. N IX durch einstündiges Erhitzen im Wasserbad bei 100 C. Da unsere sprossungswirksame Substanz hitzestabil war, mußte nach diesem Vorgang ihre biologische Aktivität wiederherzustellen sein.

T A B E L L E 10

Reversible Hemmung der Biotinwirkung an kleinen
Zellen (5 Stunden vorbelüftet) durch Avidin.

Zeit in Stunden		Beginn	1	1 $\frac{1}{2}$	2	2 $\frac{1}{2}$	3	4	4 $\frac{1}{2}$
	eingesetzte Substanzmenge pro Milliliter								
% Sprossung		%	%	%	%	%	%	%	%
Kochsaft	6 mg/1 ml	5	7	48	78	95	95	95	95
negative Kontrolle		4	6	5	10	12	13	13	15
Avidin	300 / 1 ml	4	4	5	6	7	8	8	7
Biotin	200 / 1 ml	4	8	10	22	28	32	60	75
Avidin + Biotin	300 + / 1 ml 200	3	3	4	9	8	7	9	10
Avidin 1 Std. bei Biotin 100 C	300 + / 1 ml 200	1	1	3	4	5	34	55	56

T A B E L L E 11

Reversible Hemmung der biologischen Wirkung von
Fraktion N IX durch Avidin an kleinen Zellen
(5 Stunden vorbelüftet).

Zeit in Std.		Beginn	1	1 $\frac{1}{2}$	2	2 $\frac{1}{2}$	3	4	5
eingesetzte Substanzmenge pro Milliliter									
% Sprossung		%	%	%	%	%	%	%	%
Kochsaft	6 mg/1 ml	5	7	46	75	95	95	95	95
negative Kontrolle		5	8	9	8	10	12	12	12
Avidin	300 /1 ml	6	5	5	8	6	8	8	8
Biotin	200 /1 ml	3	4	8	10	22	28	46	52
N IX	1,1 mg/1 ml	5	4	6	36	42	44	53	55
Biotin + Avidin	200 /1 ml + 300 /1 ml	6	5	6	6	8	14	15	16
N IX + Avidin	1,1 mg /1 ml + 500	5	3	4	8	6	8	7	8
N IX + Avidin	1 Std. 1,1 mg + bei 100 C 500 /1 ml	5	6	8	32	40	41	48	50
Kochsaft + Avidin	6 mg / 1 ml + 500	6	5	6	4	10	12	14	16

2.6.3.1. Ergebnisse

Aus den Tabellen 10 und 11 geht hervor, daß durch Zugabe entsprechender Avidineinheiten (2:3) bzw. Avidin im Überschuß zur sprossungsanregenden Substanz Biotin (s. Tab. 10 und 11) und zur Fraktion N IX (s. Tab. 11), die Sprossung in beiden Fällen eindeutig gehemmt wird. Dies trifft auch ein bei Zugabe von Avidin zu Kochsaft (s. Tab. 11), ein Beweis dafür, daß eine Sprossung bei vollständiger Blockierung der Biotinwirkung nicht möglich ist. Durch Denaturierung des Avidins im inaktiven Avidin-Biotin-Komplex ist die biologische Aktivität wiederherzustellen.

3. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

In den dieser Arbeit unmittelbar vorausgegangenen Versuchen hatte WORTBERG⁽²¹⁾ bei der chromatographischen Auftrennung der Nucleotide in Extrakten aus Hefezellen eine Fraktion, die von ihm als N IX bezeichnet wurde, gefunden. Es zeigte sich, daß diese Fraktion im Sprossungsversuch an Hefezellen die Anregung der Sprossung verursachte, also einen oder mehrere Faktoren enthalten mußte, die für die Vermehrung wichtig waren. Bei der weiteren Auftrennung dieser Fraktion mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie hatte sich gezeigt, daß in ihr mindestens acht Substanzen enthalten waren. Eine eindeutige Lokalisierung des Vermehrungsfaktors war jedoch nicht möglich. An diesem Punkt setzten die eigenen Untersuchungen ein.

Bei Wiederholung der Dünnschichtchromatographie ergab sich erneut, daß es zwar möglich war, sechs bis acht Einzelstoffe zu finden, die sich bezüglich ihrer Absorption im UV-Licht und Eigenfluoreszenz optisch unterscheiden ließen. Die sprossungsanregende Aktivität war jedoch keinem speziellen Fleck zuzuordnen, sondern war über die ganze Laufstrecke verteilt, was sich später damit erklären ließ, daß ein nicht optimales Fließmittel benutzt worden war.

Als weitere Trennmethode wurde deshalb die Gelfiltration mit Hilfe von Sephadexsäulen in mehreren Versuchen eingesetzt. Dabei wurden zwei peaks, gemessen an der ultravioletten Absorption bei 260 nm, erhalten. Eine Konzentrierung des gesuchten Vermehrungsfaktors war jedoch auch hier nicht eingetreten.

Nach dem negativen Ausfall der beschriebenen Versuche, die letztlich alle auf eine Abtrennung von Nucleotiden oder zumindest von Substanzen, die bei 260 nm eine Absorption besaßen, ausgingen, war es wenig wahrscheinlich, daß ein Einzelnucleotid oder eine Kombination der in der Fraktion N IX enthaltenen Nucleotide die Hefesprossung in Gang brachte. Es erschien wahrscheinlicher, daß es sich um eine Substanz handelte, die sich bei einer bestimmten Ionenstärke und pH von der DOWEX-Säule ablöste und während der Gelfiltration mitschmierte.

Um sie auf Grund bestimmter Löslichkeitseigenschaften zu erfassen, wurde das STAS-OTTO Verfahren angewendet, das mittels verschiedener Ausschüttelungsschritte hydrophile und lipophile Substanzen bei ansteigendem pH trennt. Als Endergebnis war festzustellen, daß weder bei saurer noch bei alkalischer Reaktion das Agens in Äther oder Chloroform überging, sondern stets in der wässrigen Phase zu finden war. Hieraus ergab sich, daß es sich bei unserer gesuchten Substanz um einen sehr gut wasserlöslichen Stoff und eine relativ starke Säure handeln mußte.

Einen weiteren Hinweis lieferten Versuche, bei denen in einer weitgehend gereinigten Fraktion N IX die Anwesenheit von Schwefel nachgewiesen werden konnte. Zusammen mit weiteren bis dahin gefundenen Eigenschaften der gesuchten Substanz, nämlich: Thermostabilität, Empfindlichkeit gegenüber ultravioletten Strahlen, relativ starke Säure, kein charakteristisches Spektrum im UV- als auch im sichtbaren Bereich sowie eine Wirkungshemmung durch Avidin, wurde als weitere Arbeitshypothese angenommen, daß es sich um einen Stoff handelt, der gleiche Eigenschaften besitzt wie der bekannte Wachstumsfaktor Biotin.

Als besonders bedeutsames Ergebnis stellte sich heraus, daß Biotin nur an sog. großen Zellen, die unmittelbar vor der Sprossung stehen, wirksam ist, während an kleinen, noch nicht für die Sprossung reifen Zellen, keine Sprossung, auch nicht nach fünf Stunden, zu erzielen ist.

Interessant ist dabei die Beobachtung, daß die Fraktion VoV des wässrigen Vorlaufs eine Stoffgruppierung beinhaltet, die einerseits durch Avidin inaktiviert wird und andererseits nicht sprossungsbereite kleine Zellen in relativ kurzer Zeit, gemessen an der Sprossungsdauer normaler großer Zellen, zu einer Größe heranwachsen läßt, die zwar noch deutlich kleiner ist, als die normaler großer Zellen, dann aber spontan zur Sprossung kommen.

Daraus kann man wohl schließen, daß Biotin nur in einem bestimmten Stadium oder bei einer bestimmten Konstellation des Stoffwechsels

für die Hefesprossung von Bedeutung sein kann. Welche Stoffwechselreaktionen im einzelnen entscheidend sind, muß vorerst offen bleiben.

Nach unseren derzeitigen Kenntnissen ist Biotin an sehr verschiedenartigen Stoffwechselreaktionen beteiligt; so ist D(+)-Biotin prosthetische Gruppe der Carboxylasen, die eine ATP-abhängige CO_2 -Fixation katalysieren und dadurch die Energie zur Synthese einer C-C Bindung liefern ($\text{OCHOA}^{(12)}$). Hierzu gehören Propionyl-CoA-carboxylase, Methylcrotonyl-CoA-carboxylase und Pyruvat-carboxylase. Biotin ist ebenfalls die aktive Gruppe von Carboxyltransferasen (z.B. Katalyse der Übertragungsreaktion einer Carboxylgruppe vom Methylmalonyl-CoA zum Pyruvat um Propionyl-CoA und Oxalacetat zu bilden). Es ist weiterhin an der Synthese der Fettsäuren beteiligt und bei der reduzierenden Carboxylierung ($\text{OCHOA}^{(12)}$), die durch das Malat-Enzym (malic enzyme) katalysiert wird, mutmaßlicher Cofaktor.

Als eine wahrscheinliche Bedeutung bietet sich weiter an, daß es auch in die Synthese von Purinbasen eingreift. Darüber hinaus ist es noch am Abbau von Isoleucin beteiligt, dessen Spaltprodukte durch Isomerisierung (Bernsteinsäure) in Beziehung zum Citratcyclus kommen.

Aus allen vorliegenden Beobachtungen ist zu folgern, daß es sich bei der von uns isolierten Substanz N IX um einen Wachstumsfaktor handeln muß, der nur auf sprossungsbereite Zellen direkt einwirken kann. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich um Biotin, wobei offen bleiben muß, ob die Substanz in Form der freien Säure in die biologischen Vorgänge eingreift, zumal Biotin als Peptid in Form des Biocytins bekannt ist.

4. ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch Kombination von fraktionierter Zentrifugation und zeitlich genau bemessener Belüftung handelsüblicher Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) konnten Hefezellen hergestellt werden, die gleiche Größe (5,5 - 6,0 μ) aufwiesen und im Vermehrungsversuch ein synchronisiertes Verhalten zeigten. Entsprechend gelang dies auch mit Zellen kleineren Durchmessers (ca. 3 μ).
2. Solche Zellen dienten als Testmaterial für die sprossenbildende Wirkung eines gesuchten Wuchsstoffes aus einem Perchlorsäureextrakt von Hefezellen.
3. Die Vorfraktionierung des Perchlorsäureextraktes und gleichzeitige Eliminierung kristalliner Substanzen ergaben, daß die gesamte biologische Wirksamkeit in der wässrigen Phase verblieben war, die nach dem Analysengang nach STAS-OTTO ausgeschüttelt wurden. Auch hier verblieb nach jedem Ausschüttelungsschritt lediglich die wässrige Phase sprossungswirksam.
4. Diese wässrige Phase des Perchlorsäureextraktes wurde säulenchromatographisch in sechs mit Wasser und sechzehn mit Puffer zu eluierende Fraktionen getrennt, von denen eine Fraktion N IX als einzige säurelösliche Fraktion vermehrungsanregende Wirkung besaß.
5. Der Versuch einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung von Fraktion N IX war nicht erfolgreich. Es gelang zwar, sechs bis acht fluoreszierende und absorbierende Einzelstoffe zu finden, die Sprossungswirksamkeit war jedoch keinem speziellen Fleck zuzuordnen.
6. Trennversuche der Fraktion N IX mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration konnten trotz eines markanten Elutionsdiagrammes nicht verwertet werden, da die biologische Aktivität keinem bestimmten Eluat zuzuordnen war, sondern fast während des gesamten Elutionsvorganges mitschmierte.
7. Aus den während der verschiedenen Versuche registrierten Eigenschaften unseres gesuchten Wuchsstoffes: Thermostabilität, Empfindlichkeit gegenüber ultravioletten Strahlen, relativ starke Säure, kein charakteristisches Spektrum im UV- als auch im sichtbaren Bereich, wurde als Arbeitshypothese angenommen, daß es sich bei dem gesuchten Wachstumsfaktor der Fraktion N IX um Biotin handeln könnte.
8. Mit Hilfe der Hemmversuche mit Avidin konnte der biologische Nachweis im Keimversuch erbracht werden, daß es sich bei dem sprossungsanregenden Faktor der Fraktion N IX um Biotin handelt.

5. EXPERIMENTELLER THEIL

5.1. Nährmedium zur Herstellung des Perchlorsäureextraktes

5.1.1. Herstellung des Hefekochsaftes

Die Zubereitung des Hefekochsaftes erfolgte nach Angaben von STOSSEK⁽¹⁹⁾ und JACOBI⁽⁹⁾.

200 g Frischhefe wurden mit 300 ml Aqua demin. in einem 200 ml Erlenmeyerkolben suspendiert (66%ig) und gewogen. Der Inhalt wurde auf 100 C aufgeheizt und fünfzehn Minuten bei dieser Temperatur gehalten. Nach Abkühlen der Suspension wurde erneut abgewogen und mit Aqua demin. der Wasserdampfverlust ausgeglichen. Anschließend dreißig Minuten bei 1900 x g zentrifugiert und der klare Überstand abgegossen und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 C aufbewahrt.

5.1.2. Zusammensetzung der Nährlösung nach WILLIAMSON⁽²⁰⁾

Glucose x H ₂ O	0,170 molar	=	34,00 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,015 molar	=	1,98 g
KCl	0,010 molar	=	0,74 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,0025 molar	=	0,51 g
Ca Cl ₂ x 2 H ₂ O	0,0024 molar	=	0,35 g

Dieser Nährlösung wurde ein 20%iger Citrat-Phosphat-Puffer von pH 5,8 zugesetzt.

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	0,38 molar	=	27,20 g
Citronensäure x H ₂ O	0,12 molar	=	5,04 g

Dieser Gesamtansatz wurde mit Aqua demin. auf 1000 ml aufgefüllt. Die Herstellung der Nährlösung erfolgte jeweils unmittelbar vor Gebrauch.

5.2.1. Darstellung des STAS-OTTO Ganges

Die nach der Vorfraktionierung erhaltene wässrige Phase wurde mit H₂SO₄ angesäuert und mit Äther ausgeschüttelt, die Äther-Phase im Scheidetrichter abgetrennt und mit Na₂SO₄ getrocknet. Der Rückstand aus der abgedampften sauren Äther-Phase wurde im Sprossungstest auf biologische Aktivität geprüft und als negativ befunden. Primär zu

erwarten waren hier starke organische Säuren, schwache Säuren, starke Phenole, schwache Phenole.

Die zurückgebliebene schwefelsaure wässrige Phase wurde mit Chloroform ausgeschüttelt, das CHCl_3 abgetrennt, mit Na_2SO_4 getrocknet und abgedampft. Zu erwarten waren hier schwache Basen. Der Rückstand wurde im Keimversuch eingesetzt und zeigte ein negatives Ergebnis.

Die verbleibende wässrige Phase wurde mit Na_2CO_3 neutralisiert und mit Weinsäure auf pH 4 gebracht, wobei schwach dissoziierte Säuren in Freiheit gesetzt und mit CHCl_3 ausgeschüttelt wurden.

In einem weiteren Schritt wird die verbleibende weinsaure wässrige Phase mit NaOH alkalisiert und mit Äther ausgeschüttelt, wobei man die starken Basen erfaßt. Die verbleibende wässrige Phase wird mit HCl angesäuert und mit Ammoniak alkalisiert. Die freigesetzten Substanzen wurden mit einem CHCl_3 -Isopropanolgemisch extrahiert, das mit Na_2SO_4 getrocknete Lösungsmittel abgedampft und die im wesentlichen aus Phenolbasen bestehenden Substanzen im Sprossungstest untersucht. Auch hier war das Ergebnis negativ.

5.2.2. Schema des STAS-OTTO Ganges: s. nächste Seite

5.3. Ammoniumformiatpuffer zur Elution der säurelöslichen Fraktionen

Als Puffer wurde zur Elution von Fraktion NI-IX eine 4,05m Ameisensäure- und eine 0,45m Ammoniumformiatlösung benutzt. Für die restlichen Fraktionen NX-XVI eine 8,1m Ameisensäure- und 0,9m Ammoniumformiatlösung.

5.4. Gesamtansatz eines jeden Sprossungsversuchs

Jeder Ansatz eines Sprossungsversuchs wurde mit gleichen Mengenverhältnissen durchgeführt:

Gesamtansatz: 1 ml

Hierin 1 mg Hefe suspendiert ergab eine 0,1%ige Suspension. Die Lösung setzte sich zusammen aus 0,1 ml konzentriertem Nährsalz und den restlichen 0,9 ml, die den zu untersuchenden Stoff in der gewünschten Konzentration enthielt.

5.2.2. STAS-OTTO-GANG

Substanz + H_2O mit H_2SO_4 auf pH 1 bringen
Äther

WÄSSRIGE PHASE

ÄTHER PHASE

mit $CHCl_3$ ausschütteln

WÄSSRIGE PHASE

mit Na_2CO_3 neutralisieren, mit
Weinsäure auf pH 4 bringen, mit

$CHCl_3$ ausschütteln

Schwefelsaure $CHCl_3$ -PHASE

mit Na_2SO_4 trocknen, $CHCl_3$ verdampfen

WÄSSRIGE PHASE

mit NaOH alkalisieren
ausäthern

Weinsaure $CHCl_3$ -PHASE

mit Na_2SO_4 trocknen, $CHCl_3$ verdampfen

WÄSSRIGE PHASE

mit 6n-HCl ansäuern,
mit NH_3 alkalisieren

ÄTHER PHASE

mit Na_2SO_4 trocknen, Äther verdampfen

mit $CHCl_3(3) + Isopropanol(1)$ extrahieren

WÄSSRIGE PHASE

enthält anorgan. Verbindungen
und nicht ausschüttelbare organ.
Verbindungen

$CHCl_3$ -ISOPROPANOL-PHASE

trocknen, Lösungsmittel verdampfen
Rückstand = PHENOLBASEN

ÄTHER PHASE

extrahieren mit 5% $NaHCO_3$

ÄTHER-PHASE

extr. mit 5% Na_2CO_3

a) $NaHCO_3$ -PHASE

starke Säuren

ÄTHER-PHASE

extr. mit 0,5-1% NaOH

b) Na_2CO_3 -PHASE

starke Phenole, schwache Säuren

ÄTHER-PHASE

trocknen mit Na_2SO_4 , Äther ver-
dampfen, Rückstand = Neutral-

Körper

c) NaOH-PHASE

schwache Phenole

a, b und c werden jeweils mit 6n- H_2SO_4
angesäuert und erneut mit Äther extra-
hiziert

T A B E L L E 12
 % Sprossung von synchronisierten Hefezellen nach Zusatz der Kontrolllösung (Nährsalz und Glucose)
Versuchsansatz: 0,9 ml Aqua demin.
 0,1 ml 10-fach konzentriertes Nährsalz
 1,0 mg Hefe

Zeit in Stunden	Beginn	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	3 1/2	4	4 1/2	5	5 1/2	6
% Sprossung	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
10	10	10	10	10	10	13	16	12	14	13	16	10	16
8	10	12	12	12	12	12	14	13	10	13	14	12	14
10	12	12	10	10	10	12	10	14	12	12	12	14	8
10	8	8	10	14	14	12	10	13	14	16	10	15	10
14	14	14	14	12	12	10	14	12	14	17	10	16	11
10	10	10	10	14	10	14	14	11	12	41	10	14	20
10	8	10	10	14	13	10	15	15	9	21	10	22	10
8	8	9	13	12	12	8	17	13	29	13	40	11	45
6	14	16	18	16	16	17	16	14	20	15	16	13	14
14	13	12	14	22	14	19	21	21	16	12	15	16	14
14	14	16	16	21	16	19	12	21	21	11	17	17	12
12	16	16	21	14	18	18	15	15	21	12	16	18	10
16	14	14	20	14	20	14	14	14	16	19	13	11	13
14	14	10	10	8	8	16	25	15	12	8	15	13	14
7	9	10	15	9	9	14	11	8	13	5	13	17	68
5	11	13	11	12	14	19	9	9	16	12	27	12	16
6	6	11	9	10	11	11	15	13	17	13	14	12	16
5	7	8	88	7	12	18	12	14	17	12	15	13	14
5	9	10	11	16	11	14	14	16	8	17	15	19	
8	13	12	12	12	15	16	16	14	18	18	10	10	
10	12	12	13	15	14	14	13	18	13	14	13	10	

Zahl der Versuche: n

Mittelwert: x

10	11	12	12	13	13	13	15	15	16	16	19
n	0,767	0,638	0,569	0,839	0,861	0,634	0,856	1,240	1,560	3,501	

8. Hurlbert, E.B.
H. Schmitz, A.F. Brumm
und R.v. Potter
Chromatographic separation of
acid soluble Nucleotides.
J.Biol.Chem. 209, 23 (1954).
9. Jacobi, G.
unveröffentl.
10. Karlson
Kurzes Lehrbuch der Biochemie,
(1962) Thieme Verlag, Stuttgart.
11. Michelson, A.M.
Polynucleotides Part I. Synthesis
and Properties of some Polyribo-
nucleotides.
J.Chem.Soc. 1371 (1939).
12. Severo Ochoa and
Yoshito Kaziro
Carboxylases and the Role of Biotin
Comprehensive Biochemistry 16,
210 (1965).
13. Pharmacia GmbH
Sephadex-Gelfiltration in
Theorie und Praxis.
14. Randerath, K.
und H. Stuck
Dünnschichtchromatographische Tren-
nung von Nucleinsäure-Derivaten
an Cellulose-Schichten.
15. Randerath, K.
A comparison between thin-layer
chromatographie and paperchroma-
tographie of Nucleic acid derivatives.
Biochim.biophysica Acta Amsterdam 6,
452, (1961/62).
16. Reik, R.
Studien über Ammoniumsalze.
Mh. für Chem. 23, 1033 (1902).
17. Schlüter, A.
unveröffentl.
18. Schmitz, Hanns
Isolierung von freien Nucleotiden
aus verschiedenen Geweben.
Biochem.Zschr. 325, 555, (1954)

19. Stossek, Klaus

Differenzierung von Wachstum und Vermehrung an synchronisierten Hefezellen.

Diss., Marburg 1966.

20. Williamson, D.H.

The Behaviour of Nucleic Acids in synchronously dividing Cultures of *Saccharomyces Cerevisiae*.

Exp.Cell.Res. 20, 338, (1960).

21. Wortberg, W.

Trennung vermehrungsanregender Stoffe aus Hefeextrakten von *Saccharomyces Cerevisiae*.

Diss., Marburg 1967.

Lebenslauf

Am 14. Februar 1941 wurde ich als Sohn des kfm. Angestellten Karl-Heinz Pankotsch und dessen Ehefrau Auguste Pankotsch, geb. Förster in München geboren.

Vom Frühjahr 1948 bis Frühjahr 1952 besuchte ich in Frankfurt/Main die Volksschule an der Böttgerstraße und mit Abschluß der vierten Volksschulklasse das Gymnasium "Musterschule" in Frankfurt/Main. Im Frühjahr 1954 übersiedelte ich nach Duisburg. Hier ging ich ein viertel Jahr auf das naturwissenschaftliche Mercatorgymnasium, um daraufhin auf das neu-sprachliche Gymnasium am Moltkeplatz in Krefeld zu wechseln, wo ich am 4. März 1961 meine Reifeprüfung ablegte.

Im gleichen Jahr zum Wintersemester begann ich mit dem Studium der Zahnmedizin an der Philipps-Universität Marburg/Lahn. Nach fünfsemestrigem Studium bestand ich am 26. März 1964 die zahnärztliche Vorprüfung. Nach dem zehnten Semester legte ich am 26. Januar 1967 die zahnärztliche Prüfung ebenfalls in Marburg ab. Am 31. März 1967 erhielt ich die zahnärztliche Bestallung.

Vom 15. Februar 1967 bis zum 31. März 1968 war ich am Pharmakologischen Institut Marburg/Lahn mit der Anfertigung meiner Dissertationsarbeit beschäftigt.

Zum Schluß der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Schmid für die freundliche Aufnahme im Pharmakologischen Institut, für das Thema der Arbeit, sowie für sein verständnisvolles Entgegenkommen in fachlichen Fragen und persönlichen Belangen herzlich danken.

Herrn Prof.Dr.med.Dr.med.dent.habil.H.Heuser danke ich für die Übernahme des Correferates.

Herrn Dr. Erich Weil danke ich für seine zahlreichen Hilfeleistungen und Ratschläge.

Fräulein Koch danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

